

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DES CONTAMINANTS AGRICOLES SUR L'ABEILLE DOMESTIQUE  
ET TESTS DE TOXICITÉ SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE P19

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
MAXIME GAUTHIER

SEPTEMBRE 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



## REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le résultat de plus de deux ans de travail et présente donc l'essentiel de ce que j'ai accompli dans le cadre de ma maîtrise en biologie à l'Université du Québec à Montréal. C'est grâce à une implication constante et une abnégation passionnée que j'ai réussi à livrer ce document qui, je l'espère, entrainera des avancées et de nouvelles perspectives dans l'estimation des risques associés aux contaminants agricoles.

Avec ce projet qui se termine, je tiens à adresser de sincères remerciements à tous ceux qui ont été derrière moi dans ce projet et qui m'ont fait confiance.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements les plus sincères à Monique Boily; ma directrice de recherche. Je voudrais remercier Monique Boily pour l'enseignement de qualité grâce auquel il m'a été permis de développer mes aptitudes en tant qu'étudiant-chercheur. Son esprit scientifique rigoureux, son altruisme et sa passion pour le travail bien fait m'ont transmis sa passion et une rigueur de travail précieuse. J'ai été privilégié de rencontrer et de partager le quotidien de cette chercheuse bienveillante et accomplie.

Mes remerciements vont aussi à Joanne Paquin qui m'a encouragé et soutenu durant tout mon parcours. Son encadrement critique et son sens de l'investigation m'ont beaucoup fait avancer dans mon travail avec la lignée cellulaire P19. J'aimerais souligner sa rigueur scientifique, sa patience et sa compréhension au cours du projet.

Je tiens aussi à remercier Catherine Jumarie pour son implication dans mon avancement scientifique et personnel. Sa disponibilité, sa dévotion et sa sensibilité m'ont inspiré et profondément touché. Je suis fier que nous ayons pu collaborer ensemble sur le premier article.



Mes collègues-amis ont aussi joué un rôle à la fois de soutien moral et d'aide technique dans le déroulement de mes projets. Merci à Isabelle, Reine, Clara et Lyvia. Merci aussi à Phillipe Aras et Philip Spear. Je tiens à remercier particulièrement Catherine Landry pour son appui constant et sage durant les hauts et les bas de mon épopée. Catherine, tu es une collègue, une amie et une scientifique hors pair.

Il va sans dire que les encouragements de mon conjoint Jonathan, envers qui j'ai beaucoup d'admiration, ont été très appréciés pendant les périodes plus exigeantes. Il est essentiel de le rappeler. Il a été une source d'inspiration inépuisable qui m'a alimenté durant ce projet de longue haleine. Je l'en remercie tendrement.

J'aimerais remercier aussi ma famille de Gauthier et de Raby ainsi que mes amis qui m'ont posé beaucoup de questions sur mon sujet de recherche et encouragé à persévérer. Une mention spéciale à Karine à qui je porte aussi beaucoup d'admiration pour sa persévérance dans la vie. Tu es une source de motivation pour tous ceux qui t'entourent.

Je voudrais remercier tous mes collègues du Centre de Recherche TOXEN et BioMed pour leur aide technique ou morale.

Et finalement, un merci va aussi au Département des sciences biologiques de l'UQAM et à la fondation de l'UQAM qui m'ont soutenu financièrement durant mon parcours. Cette aide a été essentielle à l'aboutissement de mon projet.

Merci à tous, sincèrement

Max

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE D'ABBRÉVIATIONS .....	XIII
RÉSUMÉ .....	XV
INTRODUCTION .....	17
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	21
1.1 Les rétinoïdes et leurs implications dans le développement.....	21
1.1.1 Métabolisme et fonctions physiologiques chez les mammifères .....	22
1.1.2 Métabolisme et fonctions physiologiques chez les insectes .....	28
1.1.3 Biomarqueurs à base de rétinoïdes.....	30
1.2 Contaminants agricoles.....	32
1.2.1 Néonicotinoïdes.....	32
1.2.2 Éléments traces métalliques .....	34
1.2.3 Implication des contaminants agricoles dans la santé des abeilles .....	36
1.3 Aspects pertinents à des biomarqueurs du système nerveux .....	39
1.4 Objectifs et hypothèses .....	39
CHAPITRE II	
LOW DIETARY LEVELS OF AL, PB AND CD MAY AFFECT THE NON- ENZYMATIC ANTIOXIDANT CAPACITY IN CAGED HONEYBEES (APIS MELLIFERA)	
2.1 Abstract.....	44
2.2 Introduction.....	45
2.3 Materials and methods.....	47
2.3.1 Chemicals.....	47
2.3.2 Honey bee exposure .....	47
2.3.3 Metal content analyses .....	48
2.3.4 Tissue preparation .....	49
2.3.5 Alpha-tocopherol analysis.....	49

2.3.6 TBARS analysis (lipid peroxidation) .....	50
2.3.7 Metallothionein-like proteins (MTLPs) analysis.....	50
2.3.8 Protein concentration .....	51
2.3.9 Statistical analysis.....	51
2.4 Results and discussion .....	52
2.5 Conclusion .....	64
2.6 Acknowledgement.....	64
2.7 Appendix A: Supplementary data .....	65
2.8 References .....	66
CHAPITRE III	

#### CHRONIC EXPOSURES TO IMIDACLOPRID OR THIAMETHOXAM ALTER REDOX STATE AND CAROTENOID-RETINOID LEVELS IN CAGED HONEYBEE (APIS MELLIFERA)

3.1 Abstract .....	70
3.2 Introduction.....	71
3.3 Materials and methods .....	75
3.3.1 Chemicals .....	75
3.3.2 Honey bee exposure.....	75
3.3.3 AChE measurements .....	76
3.3.4 Tissue preparation for (pro)-vitamins and TBARs assays.....	77
3.3.5 Carotenoids, retinoids and $\alpha$ -tocopherol analysis .....	78
3.3.6 Lipid peroxidation quantification .....	79
3.3.7 Statistical analysis.....	79
3.4 Results and discussion .....	83
3.5 Conclusion .....	97
3.6 Acknowledgement.....	98
3.7 References .....	99
CONCLUSION .....	107
APPENDICE A	

MISES AU POINT DES TESTS DE TOXICITÉ DES NÉONICOTINOÏDES SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE EMBRYONNAIRE P19 .....	111
RÉFÉRENCES .....	134

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Structures moléculaires des rétinoïdes principaux des vertébrés.....	23
Figure 2.1 Means $\pm$ SD of bee metal content (mg/bee, bars), metal bioconcentration ratio (bee/syrup, black circles) and metal retention (% total intake, open circles) based on syrup consumption after 10-day exposure. A) Al. B) Pb. C) Cd. Mean retentions of each metal were compared with Kruskal-Wallis (* $p$ < 0.05; ** $p$ < 0.01; *** $p$ < 0.001) .....	55
Figure 2.3 Metallothionein-like proteins (MTLPs) in honey bee after 10-day exposure to metals. A) Typical reverse phase HPLC chromatogram of MTLPs (mg/g of tissue) for honey bees exposed (solid line) or not (dashed line) to Cd (0.05 ppm) Means $\pm$ SD of MTLPs contents after exposure to increasing concentrations of B) Al C) Pb and D) Cd. Metal-treated bees were compared to the control group using GLM one-way analysis of variance followed by Dunnett $t$ test (* $p$ < 0.05; *** $p$ < 0.001).....	63
Figure 2.4 Survivorship for honey bees exposed for 10 days to increasing concentrations (mg/L sugar syrup) of A) NaCl, B) Al, C) Pb and D) Cd. Survival curves were compared using pairwise Kaplan-Meier analysis (** $p$ < 0.01) .....	65
Figure 3.1 Retinoid metabolism as known in vertebrates (bold text) and insects (italic). A) Niemann–Pick C1-like 1 (Reboul, 2013) / <i>Neither inactivation nor afterpotential D (NinaD)</i> B) Carotenoid mono-oxygenase 1 (CMO1) / <i>Neither inactivation nor afterpotential B (NinaB)</i> C) Retinal Dehydrogenase (RALDH) or Aldehyde dehydrogenase (ALDH) D) Retinal reductase (Rrd) / <i>Short chain dehydrogenases/reductases (SDRs)</i> E) Retinol dehydrogenase (Rdh) F) Lecithin retinol acyltransferase (LRAT) or Acyl CoA:retinol acyltransferase (ARAT) G) Retinyl ester hydrolase (REH) H) Cytochrome P450 26 (CYP26).....	73
Figure 3.2 HPLC chromatogram of whole honey bee extract. Peaks are (1) 13- <i>cis</i> RA (2) 9- <i>cis</i> RA (3) all- <i>trans</i> RA (4) ROL and (5-6) <i>cis/trans</i> RALD. Peaks were identified with commercial standards. ....	81



Figure 3.3 Means  $\pm$  SD of TBARs (ng/ $\mu$ g triglycerides) contents in honeybees exposed to increasing doses of imidacloprid (A) and thiametoxam (B). One-way analysis of variance followed by Dunnett  $t$  test  $\dagger p < 0.1$  .....90

Figure A.1 Vue simplifiée de la corticogénèse chez des mammifères (Rice et Curran, 2001). (A) La corticogénèse commence avec l'apparition de la préplaque (pp) qui se retrouve exactement au-dessus de la zone ventriculaire (vz) et contient les cellules Cajal-Retzius (CR) ainsi que les neurones de la sous-plaque corticale (SP). La première cohorte de cellules de la plaque corticale migre à travers la sous-plaque corticale jusqu'aux cellules de Cajal-Retzius de la zone marginale (mz). Les cohortes de cellules suivantes migrent à travers les strates déjà créées et se positionnent à leur tour devant les cellules de Cajal-Retzius épaississant ainsi le tube neural. Six couches neuronales sont ainsi générées. (B) Histochimie des couches neuronales chez la souris de type sauvage et chez la souris de type reeler.....113

Figure A.2 A) Courbe spectrale du formazan entre 350nm et 750nm (incrément = 10nm) effectuée à l'aide du spectrophotomètre (Infinite M1000 Quadruple Monochromator Microplate Reader, Tecan Group Ltd). B) Courbe d'étalonnage ( $n = 3$ ) de la différence d'absorbance du formazan (550nm-664nm) en fonction du nombre de neurones P19ensemencées par puits au jour 4 (Équation :  $y = 1,1388x - 0,0669$ .  $R^2 = 0,9816$ ). Le test MTT a été réalisé au jour 6, après 48h de culture. ....121

Figure A.3 Courbe de survie de neurones P19 exposés durant 48h (entre jour 4 et 6) à différentes concentrations de DMSO (0-0,5% v/v). *Le contrôle (sans DMSO) a été utilisé comme référence (100%) à la suite de tests de viabilité MTT ( $n = 4$  sauf pour point 0,3 et 0,5 où  $n = 3$ ). Un nombre de  $1 \times 10^6$  cellules par puits a été utilisé.* .....123

Figure A.4 Courbes de survie cellulaire (%) pour des neurones P19 cultivés 48h en présence de différentes concentrations (1/-log mM) d'IMI, de THM et de CLO A) Produits purs (P) et B) Formulations commerciales (C). *Les produits purs étaient dissous dans DMSO (concentration finale= 0,2%) et comparés au contrôle (véhicule seulement) tandis que les formulations commerciales étaient dissoutes dans le milieu de culture directement et comparées avec le contrôle sans DMSO à la suite de tests de viabilité MTT ( $n = 3$ ). Un nombre de  $1 \times 10^6$  cellules par puits a été utilisé.* .....125

Figure A.5 Courbes de survie cellulaire (%) pour des neurones P19 cultivés en présence de différentes concentrations de THM (1/-log mM) pur (P) ou commercial avec DMSO (C+DMSO) et sans DMSO (C-DMSO). *Le THM pure et commercial (avec DMSO) étaient dissous dans DMSO (concentration finale= 0,2%) et les valeurs d'absorbance des différentes concentrations étaient comparées à leur*

*contrôle respectifs tandis que la formulation commerciale (sans DMSO) était dissoute dans le milieu de culture directement et comparée avec son contrôle. Un nombre de  $1 \times 10^6$  cellules par puits a été utilisé en duplicata à la suite des tests de viabilité MTT ( $n = 3$ ). ..... 127*

Figure A.6 Immunobuvardage de type western des différents fragments de la reeline (180 et 300 et 400kDa) produite par des neurones P19 (jour 6) dans 3 cultures indépendantes (A, B et C). L'échantillon A a été dilué (FD2 et FD4). La méthode expérimentale utilisée est une version améliorée de celle décrite par Ducharme et al., (2010). Les anticorps utilisés étaient 1<sup>er</sup> anti-reeline (G10) et 2<sup>e</sup> POD-anti-igG de souris. .... 129

Figure A.7 A) Analyses densitométriques des différents fragments de reeline (180, 300 et 400kDa) pour 3 cultures indépendantes (▨ = 400kDa, ▩ = 300kDa et ▪ = 180kDa) et B) Dilution nécessaire pour la détection de la reeline dans les milieux de culture des neurones P19 au jour 6 (■ = FD1, ■ = FD2 et □ = FD4). Les mesures ont été prises avec le logiciel imageJ 1.50e à partir de la figure A.6 en soustrayant une valeur contrôle dans la piste de migration. . 130

Figure A.8 Activité de l'AChE (mDO/ $\mu$ l/min) dans différents milieux réactionnel faisant varier le volume de lysat de neurones P19 au jour. Concentration finale d'ACH (0,75mM) et de DTNB (0,3mM). La concentration de donepezil utilisée est 0,184mM. Écarts type sur les valeurs de tetraplicatas. La mention 2 lysats représente l'équivalent de 2 puits de neurones P19 resuspendu dans le même volume que pour les autres bandes qui ne comprennent qu'un puits. .... 132





## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Table 2.1 Survival, mass, protein and tocopherol (means $\pm$ SD) measured in honey bees exposed for 10 days to increasing concentrations of chloride, Al, Pb or Cd .....	53
Table 3.1 Means ( $\pm$ SD) of body mass, survival and daily consumption of contaminated syrup for honeybees exposed to increasing doses of insecticides for 10 days .....	85
Table 3.2 Means $\pm$ SD of carotenoids, $\alpha$ -tocopherol and triglycerides contents (ng/g tissue) in whole honeybee and head protein concentration (mg/g tissue) and AChE (mOD/g prot/h) activity in bees exposed to increasing doses of insecticides for 10 days.....	88



## LISTE D'ABBRÉVIATIONS

AChE	Acétylcholinestérase
AR	Acide rétinoïque
ARAT	Acyl coenzyme A : rétinol acyltransférase
$\beta$ CMO-1	$\beta$ , $\beta$ -carotène 15,15 monooxygénase-1
BMPs	Protéines morphogénétiques osseuses
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CLO	Clothianidine
CRABP I-II	Protéines de liaison de l'acide rétinoïque cellulaire I-II
CRBP	Protéine de liaison du rétinol cellulaire
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTNB	Acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)
EcR	Récepteur à l'ecdysone
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
ÉTM	Éléments Traces Métalliques
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HER	Hydrolase des esters de rétinol
IMI	Imidaclopride
LRAT	Lécithine : rétinol acyltransférase
MTLPs	Protéines analogues à la métallothionéine
NinaB	« Neither inactivation nor afterpotential B »
PINTA	« Prolonged depolarization afterpotential is not apparent »
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
RALD	Rétinaldéhyde
RALDH	Déshydrogénase du rétinol
RAR	Récepteur à l'acide rétinoïque
Rdh	Déshydrogénase du Rétinol
RBP	Protéine de liaison du rétinol
ROL	Rétinol
Rrd	Rétinaldéhyde réductase
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SHH	Sonic Hedgehog
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
THM	Thiaméthoxame
TTR	Transthyrétine
UV	Ultra-violet



## RÉSUMÉ

Dans la dernière décennie, la surmortalité de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) en Amérique du Nord et en Europe a considérablement stimulé la recherche autour de la santé de ces pollinisateurs. Aujourd'hui, il est reconnu que ce phénomène est la conséquence d'un ensemble de facteurs, notamment l'utilisation d'insecticides systémiques en agriculture. Malgré les évidences suggérant l'implication des néonicotinoïdes dans ce déclin annuel, les risques encourus par ces insectes pollinisateurs et autres populations d'organismes non ciblées demandent une caractérisation plus approfondie. De plus, la présence des éléments traces métalliques (ÉTM) et les risques qu'ils posent dans les agroécosystèmes sont souvent négligés. Effectivement, l'insuffisance d'études traitant de la toxicité chronique de ces contaminants agricoles à des concentrations retrouvées dans l'environnement ne permet qu'une estimation incomplète du risque.

Dans le but de mieux documenter les effets entraînés par des expositions chroniques à certains insecticides néonicotinoïdes et ÉTM, des abeilles domestiques ont été exposées oralement (par sirop contaminé) durant 10 jours à des concentrations environnementales de métaux (Al, Pb et Cd) et d'insecticides néonicotinoïdes sous formulations techniques (imidaclopride-IMI et thiaméthoxame-THM). En parallèle, des tests de toxicité ont été développés avec une lignée cellulaire de souche murine (P19) afin d'étudier les potentiels désordres cellulaires entraînés par une exposition à ces insecticides en formulation pure et commerciale (IMI, THM et clothianidine-CLO). L'intégralité de ces travaux ayant ultimement pour but la mise au point d'outils biomarqueurs à base physiologique, différents systèmes ont été explorés. Chez les abeilles exposées aux métaux et aux insecticides, la peroxydation des lipides a été quantifiée avec l'utilisation du test de réactivité à l'acide thiobarbiturique (TBARS) ainsi qu'au dosage de l' $\alpha$ -tocophérol par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection UV (CLHP-UV). De plus, pour les abeilles exposées aux métaux, des protéines analogues aux métallothionéines (MTLPs) ont été quantifiées par CLHP-UV. En complément, chez les abeilles exposées aux néonicotinoïdes les niveaux de certains rétinoïdes (acide rétinoïque 9/13-*cis* et tout-*trans*, rétinaldéhyde et rétinol), caroténoïdes (diatoxanthine, lutéine, zéaxanthine,  $\alpha/\beta$ -cryptoxanthine et  $\alpha/\beta$ -carotène) et l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) ont été quantifiés par CLHP-UV et la méthode d'Ellmann, respectivement. Grâce au suivi de la consommation de sirop, ainsi que la quantification de métaux dans les corps d'abeille après l'exposition, l'ordre des ratios de bioconcentration ont été les suivants : Cd > Pb > Al. Les abeilles exposées au Cd ont montré une augmentation des niveaux de MTLPs. Le Cd et le Pb ont causé une augmentation des niveaux d' $\alpha$ -tocophérol, mais seul l'Al a entraîné une



altération de la peroxydation des lipides. Pour les abeilles exposées aux néonicotinoïdes, bien qu'aucune altération n'ait été enregistrée pour les activités de l'AChE, l'IMI a entraîné une augmentation des niveaux d' $\alpha$ -carotène et d' $\alpha$ -tocophérol. Pour ce qui est du THM, des diminutions d'acide rétinoïque 13-*cis* et de rétinol ont été observées ainsi qu'une augmentation dans la peroxydation des lipides.

En conclusion, ces travaux documentent un éventail de bouleversements entraînés par des expositions chroniques à des concentrations environnementales de métaux et d'insecticides néonicotinoïdes. Ils renforcent le potentiel de l'abeille domestique à des fins d'espèce bio-indicatrice dans des cas de contamination en métaux. De plus, le lien plausible entre l'induction d'un stress oxydant par les néonicotinoïdes et l'altération des niveaux de rétinoïdes demande plus d'investigation chez l'abeille domestique. Finalement, cette étude aidera au développement d'outils biomarqueurs et soulève une nouvelle perspective dans l'analyse du risque encouru par les populations de pollinisateurs.

Mots clés : Néonicotinoïdes, éléments traces métalliques, *Apis mellifera*, rétinoïdes, caroténoïdes,  $\alpha$ -tocopherol, MTLs, acétylcholinestérase, peroxydation des lipides, CLHP-UV, biomarqueurs

## INTRODUCTION

Entre 2009 et 2013, la production mondiale de grain (blé, maïs, soya, avoine, canola et orge) n'a cessé de s'accroître contrairement à sa demande qui elle, est restée relativement stable. Afin de permettre une production canadienne annuelle de 70 millions de tonnes entre 2009 et 2013, ce sont environ 928 500 hectares québécois qui ont été annuellement affectés à la culture du grain. Pour cette même période, les cultures du maïs et du soya ont dominé les surfaces associées aux grandes cultures, correspondant respectivement à 42% et 30% des superficies (MAPAQ, 2009). La majorité de ces cultures sont retrouvées dans les régions administratives de Montérégie et Centre-du-Québec (MAPAQ, 2009).

Il est bien connu que l'exigence en matière de rendement dans le secteur agroalimentaire appelle à une utilisation importante de produits phytosanitaires en grandes cultures, notamment plusieurs pesticides (herbicides, insecticides, fongicides, etc.) et engrais de différentes natures. En ce sens, depuis les 20 dernières années, les pratiques agricoles ont entraîné une transformation et une croissance du marché agrochimique mondial. En contrepartie, l'utilisation parfois massive d'engrais et de pesticides en vue de contrôler les populations de ravageurs en zone agricole a soulevé son lot d'inquiétude vis-à-vis les organismes exposés involontairement à ces produits ainsi que pour les humains.

En Amérique du Nord et en Europe, la surmortalité des abeilles domestiques (*Apis mellifera*), souvent associée à l'utilisation d'insecticides néonicotinoïdes en agriculture, suscite la controverse. Tandis que plusieurs évidences suggèrent une forte



implication de ces insecticides dans la mortalité anormale d'abeille, peu d'études ont démontré les effets d'une exposition chronique à ces composés chez les insectes pollinisateurs. Ainsi, bien que l'utilisation prophylactique de ces insecticides présente un risque considérable pour la santé des pollinisateurs, le manque d'études effectuées avec des concentrations retrouvées dans l'environnement durant de longues périodes ne permet qu'une évaluation du risque incomplète. De plus, à la suite d'études récentes démontrant des effets délétères des néonicotinoïdes chez des espèces vertébrées (oiseaux, poissons et mammifères), le besoin de mieux comprendre l'implication de ces insecticides dans la santé des organismes non ciblés apparaît indispensable.

Bien que l'inquiétude qui sévit au sujet des néonicotinoïdes soit justifiée et demande des tests toxicologiques plus approfondis, plusieurs autres intrants dans les agroécosystèmes méritent également une attention. C'est le cas de l'utilisation des boues d'épurations épandues dans les champs agricoles qui peuvent contenir des concentrations variables d'ÉTM. Cette méthode de valorisation des boues issues du traitement des eaux usées est utilisée à des fins de fertilisation dans les champs québécois, mais considérant le manque de connaissances sur la dynamique des métaux dans les agroécosystèmes et sur leur toxicité chez les insectes pollinisateurs on ignore si les niveaux d'ÉTM dans les agroécosystèmes posent un risque pour la santé de ces populations.

Dans ce contexte, il est essentiel de mieux documenter les effets entraînés par des expositions chroniques aux insecticides néonicotinoïdes et aux ÉTM sur l'abeille domestique à des concentrations retrouvées dans l'environnement. Ainsi, cela pourra ultimement permettre une meilleure estimation des risques encourus par les abeilles domestiques et autres pollinisateurs et favoriser la mise au point de biomarqueurs utilisés dans le suivi de la santé de ces populations.

Le document se présente comme suit : le premier chapitre fait état des connaissances générales nécessaires à la compréhension des résultats obtenus. Le second chapitre est constitué d'un article publié dans la revue *Chemosphere* qui traite des effets relatifs à une exposition chronique aux métaux chez l'abeille domestique et de son utilisation potentielle à des fins d'espèce bio-indicatrice. Le troisième chapitre contient l'intégralité d'un article qui sera soumis dans la revue *Environmental pollution* décrivant certains effets d'une exposition chronique aux insecticides néonicotinoïdes sur l'abeille domestique. Finalement, le lecteur pourra consulter en Appendice A une section allouée uniquement à la mise au point de tests toxicologiques sur la lignée cellulaire embryonnaire P19.



## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.1 Les rétinoïdes et leurs implications dans le développement

Les rétinoïdes forment une classe de molécules issue du métabolisme des caroténoïdes (pigments végétaux) et dont la structure s'apparente à celle de la vitamine A aussi appelée rétinol (ROL). Chimiquement, ils sont définis par la présence d'un anneau cyclohexane triméthylé suivi d'une chaîne tétraène terminé d'un groupement fonctionnel carbone-oxygène. En raison de la diversité de leurs précurseurs caroténoïdes et des transformations biochimiques que peuvent subir ces molécules, il existe une grande variété de rétinoïdes chez les organismes vivants. Bien que certains éléments de la machinerie enzymatique relative au métabolisme des rétinoïdes aient été identifiés chez plusieurs ancêtres métazoaires, nos connaissances sur le métabolisme des rétinoïdes sont loin d'être aussi complètes chez les insectes que chez les mammifères. Il n'en reste pas moins que l'acide rétinoïque (AR) semble partager certaines similarités au niveau de ses implications développementales à travers l'évolution (Albalat, 2009).

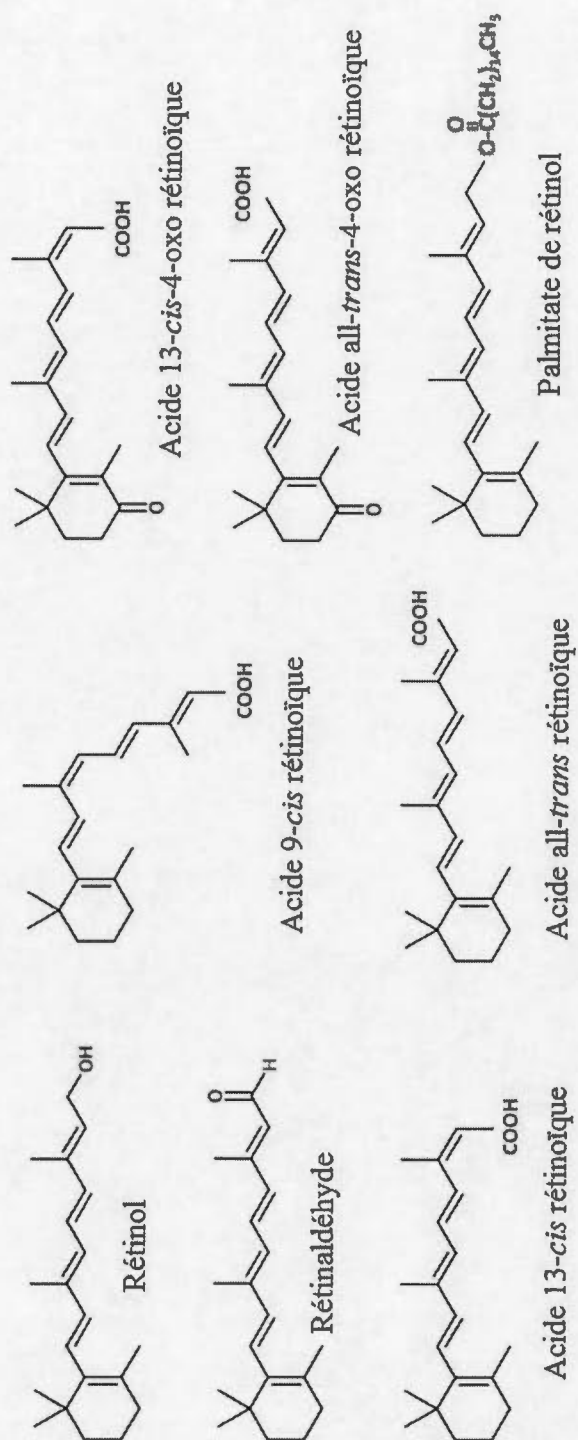
### 1.1.1 Métabolisme et fonctions physiologiques chez les mammifères

#### 1.1.1.1 Métabolisme

Les rétinoïdes sont des molécules essentielles à la croissance et au développement. Parmi ces derniers, on y retrouve, entre autres, le ROL et ses esters, le RALD et l'AR ainsi que ses métabolites polaires (Figure 1.1). Au niveau alimentaire, bien qu'ils proviennent de la métabolisation des pigments caroténoïdes, ils peuvent aussi provenir d'esters de ROL (forme de stockage) lorsque des tissus animaux sont consommés. Qu'ils proviennent d'origine animale ou végétale, une séquence de transformations enzymatiques est nécessaire afin d'obtenir la forme la plus biologiquement active : l'AR (Figure 1.2).

Tout au long du catabolisme des caroténoïdes en rétinoïdes, plusieurs mécanismes enzymatiques (oxydation, réduction et isomérisation) ou de séquestration par des protéines de liaison sont finement orchestrés afin de moduler les niveaux disponibles d'AR. Tout d'abord, le clivage oxydatif des caroténoïdes, catalysé par la  $\beta$ ,  $\beta$ -carotène 15,15 monooxygénase-1 ( $\beta$ CMO-1) au niveau du double lien 15,15, constitue une étape charnière largement étudiée en raison de son rôle en amont du métabolisme des rétinoïdes. Sa sélectivité détermine si un substrat est provitamine A. Lorsqu'elle utilise son substrat principal, la  $\beta$ -carotène, deux molécules de rétinaldéhyde (RALD) tout-*trans* sont produites. Malgré son appellation qui porte à croire que la  $\beta$ CMO-1 ne clive que la  $\beta$ -carotène, il a été clairement démontré que cette enzyme, retrouvée chez plusieurs vertébrés (poisson, souris, poulet et humain), reconnaît et clive avec différentes affinités plusieurs substrats comme d'autres isomères de carotène ( $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$ ),

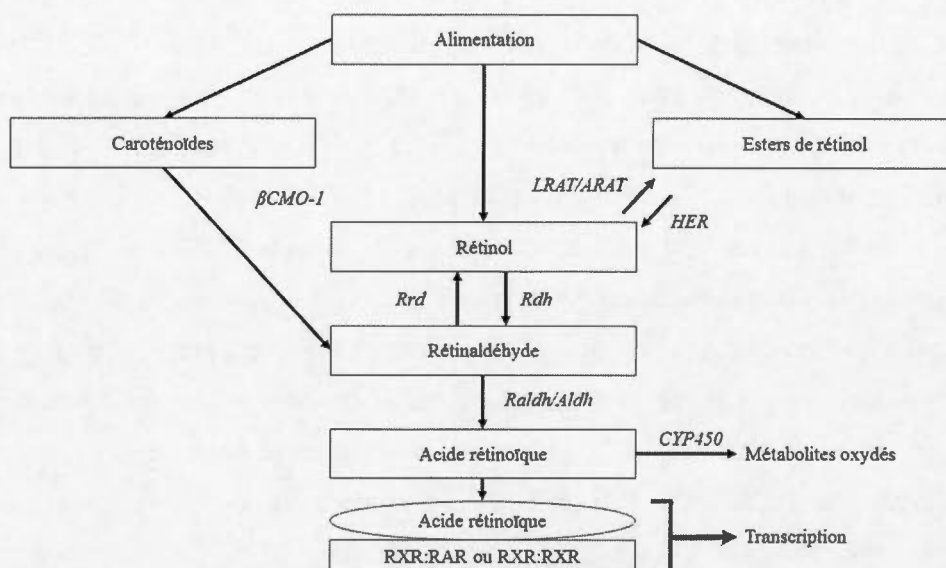




**Figure 1.1** Structures moléculaires des rétinoïdes principaux des vertébrés.







**Figure 1.2** Métabolisme des caroténoïdes/rétinoïdes des vertébrés (adaptée de Rhee et Plutzky, 2012). Les esters de ROL sont d'abord hydrolysés dans la lumière de l'intestin et le ROL libre est internalisé dans les entérocytes par des mécanismes encore peu connus (Reboul, 2013). Il est alors estérifié à nouveau par la lécithine : ROL acyltransférase (LRAT) ou l'acyl coenzyme A : ROL acyltransférase (ARAT) et est intégré dans les chylomicrons. Sous cette forme, il est sécrété dans le système lymphatique puis dans la circulation sanguine en direction du foie. Les caroténoïdes ingérés sont émulsifiés dans l'intestin avec les graisses à l'aide des sels biliaires et s'agglomèrent en micelles. Une fois ces micelles endocytés par les entérocytes, les caroténoïdes amorcent leur métabolisation par l'oxydation centrale catalysée par l'enzyme  $\beta$ CMO-1. Le RALD produit est réduit en ROL par la réductase du RALD (Rrd) et est estérifié par LRAT ou ARAT afin d'être envoyé vers le foie par la circulation lymphatique et sanguine, comme décrit plus haut. C'est dans le foie que s'accumulent majoritairement les réserves de ROL sous forme d'esters. Au besoin, ces esters seront hydrolysés par l'hydrolase des esters de ROL (HER) en ROL et envoyé dans la circulation pour les tissus périphériques. Il voyagera sous forme de complexe avec la protéine de liaison du ROL (RBP) et la transthyrétine (TTR). Une fois dans la cellule cible, il pourra être transformé de façon réversible en RALD sous l'action de la déshydrogénase du ROL (Rdh), puis de façon irréversible en AR par la déshydrogénase du RALD (RALDH). C'est sous cette forme qu'il pourra se lier aux récepteurs nucléaires afin d'agir au niveau transcriptionnel. Finalement, l'AR peut être dégradé par des enzymes du cytochrome P-450 en métabolites plus polaires comme l'acide tout-trans-4-hydroxy-rétinoïque et en acide tout-trans-4-oxo rétinolique.

la  $\beta$ -cryptoxanthine et certains apo-carotènes (Redmond *et al.*, 2001; Lampert *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2007; Kim et Oh, 2009 ; dela Seña *et al.*, 2013; Burri, 2015). Jusqu'à maintenant, il semblerait que la  $\beta$ CMO-1 soit plutôt restreinte aux substrats à longues chaînes carbonées (30 carbones et plus) et à la présence d'un cycle  $\beta$ -ionone. Son activité est donc cruciale dans le fonctionnement du métabolisme des rétinoïdes. De plus, des isomérases sont aussi responsables de la conversion entre les formes *cis* et *trans* des rétinoïdes afin de moduler leur affinité biochimique. En plus des étapes de transformation enzymatique, une modulation par fixation à des protéines de liaison est observée. Plusieurs de ces protéines ont été énumérées dans la littérature dont la RBP, la protéine de liaison du ROL cellulaire (CRBP) et la protéine de liaison de l'AR cellulaire I et II (CRABP I et II) qui sont aussi responsables de moduler la disponibilité de certains rétinoïdes dans les compartiments intra- ou extracellulaires.

#### 1.1.1.2 Fonctions physiologiques

Aujourd'hui, les rétinoïdes sont reconnus chez les vertébrés pour leur importante implication dans la croissance et la différenciation cellulaire, l'orientation antéropostérieure et régionale de l'embryon, le développement du système nerveux, l'organogénèse des poumons, du pancréas et le développement des membres. Pour ces raisons, ils reçoivent une grande attention scientifique. Plus tard dans le développement, l'AR est aussi impliqué dans plusieurs processus comme la vision, l'homéostasie et la régénération des organes et des tissus.

Mis à part l'implication du RALD dans la vision, c'est l'AR qui s'acquitte des fonctions biologiques associées aux rétinoïdes par le biais de l'activation transcriptionnelle de certains gènes. Les fonctions biologiques de l'AR reposent sur sa capacité à se lier aux

récepteurs nucléaires à l'AR (RAR) et le récepteur X des rétinoïdes (RXR) dans le noyau. Trois isomères ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) existent pour chacun de ces récepteurs et peuvent s'homodimériser (RXR : RXR) ou s'hétérodimériser (RXR : RAR) (Huang *et al.*, 2014). Ce faisant, 14 agencements ont été relevés auxquels peut se lier l'AR afin d'activer la transcription de certains gènes. Les récepteurs nucléaires possèdent une affinité propre aux différents isomères d'AR. Ainsi, parmi les différentes isoformes d'AR, les formes tout-*trans* et 9-*cis* ont une plus grande affinité pour RAR, tandis que RXR ne se lie qu'à l'isoforme 9-*cis* (Allenby *et al.*, 1993 ; Huang *et al.*, 2014). Bien que l'isoforme 13-*cis* soit aussi régulièrement retrouvé chez les animaux, son affinité pour les récepteurs nucléaires serait plus faible et son rôle biologique moins bien connu (Blaner, 2001).

#### *Implication des rétinoïdes dans la neurogénèse*

L'AR, couplé aux voies de signalisation impliquant les RAR ou les RXR, est aujourd'hui reconnu comme une molécule cruciale dans la neurogénèse. Tout d'abord, l'AR s'acquitte de deux grandes fonctions, soit de l'orientation antéropostérieure et dorso-ventrale du développement de la plaque et du tube neural. L'orientation antéropostérieure est permise par le biais de l'établissement d'un gradient d'AR qui s'installe dans l'embryon et l'orientation dorso-ventrale est assurée à l'aide de la protéine «Sonic Hedgehog» (SHH) présente dans la zone dorsale et des protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) au niveau ventral de l'embryon (Maden, 2007). Ensuite, l'AR agit comme facteur de différenciation neuronale en stimulant la transcription des gènes comme *Hoxa-1* et *Hoxb-1* (Soprano *et al.*, 2007). De plus, on a récemment observé le rôle permissif de l'AR dans une voie de signalisation qui induit



la transcription de la reeline (une protéine clef dans le développement et l'organisation du système nerveux). Effectivement, selon Chen *et al.*, (2007), l'AR permettrait la transcription du gène *Sp1* et la production de la protéine Sp1 qui agirait comme facteur de transcription pour le gène de la reeline (voir APPENDICE A).

### 1.1.2 Métabolisme et fonctions physiologiques chez les insectes

#### 1.1.2.1 Métabolisme

Certaines études récentes ont prédit, identifié et caractérisé quelques enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes chez les insectes. Chez *D. melanogaster*, *Anopheles Gambiae* et *Apis mellifera*, «Neither inactivation nor afterpotential B» (NinaB), une isoméroxygénase, a bien été caractérisée et exerce le clivage oxydatif des caroténoïdes (Figure 3.1, page 69). Cependant, en plus de son clivage oxydatif, elle effectue aussi une isomérisation *-cis* entre le carbone C11 et C12. Ainsi, en utilisant la  $\beta$ -carotène comme substrat, elle génère deux isomères différents de RALD (*-cis* et *-trans*) (Babino *et al.*, 2016). L'enzyme NinaB de l'insecte *Galleria mellonella*, semble moins restrictive quant à ses substrats en comparaison avec  $\beta$ CMO- 1 et clive plusieurs caroténoïdes ( $\alpha/\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine, lutéine et zéaxanthine) afin de produire différentes proportions d'isomères de RALD (Oberhauser *et al.*, 2008; Babino *et al.*, 2016). Aussi, 5 enzymes déshydrogénases/réductases ont été caractérisées chez *Drosophila melanogaster* et reconnaissent le RALD tout-*trans* et le RALD tout-*trans*-3-hydroxy. Ces enzymes pourraient aussi reconnaître le ROL chez certaines cellules et potentiellement s'acquitter de l'étape d'oxydation/réduction entre le RALD et le ROL (Belyaeva *et al.*,

2009). Finalement, certains gènes orthologues à *Aldh1a* chez l'humain ont été identifiés chez quelques insectes (*A. mellifera*, *Anopheles gambiae* et *Tribolium castaneum*) et pourraient coder des enzymes responsables de l'oxydation du RALD en AR (Albalat et Cañestro, 2009). Pour terminer, les enzymes responsables du stockage du ROL en esters de ROL (LRAT, ARAT ou HER) n'ont pas été détectées chez les insectes.

Généralement, les formes de rétinoïdes présentes chez les invertébrés sont cohérentes avec la diversité des enzymes que l'on retrouve dans ces organismes. D'abord, plusieurs rétinoïdes ont été observés chez certains insectes comme *Drosophila melanogaster* dont plusieurs ont des fonctions bien connues dans la vision. On retrouve les isomères hydroxylés du RALD notamment le RALD tout-*trans*-3-OH et le RALD 11-*cis*-3-OH, les formes non hydroxylées, soit le RALD tout-*trans* et le RALD 11-*cis* ainsi que le ROL tout-*trans*-3-OH (Goldsmith, 2013). D'autres formes de rétinoïdes ont été identifiées comme le ROL tout-*trans* chez des larves de chironomides et chez *Apis mellifera* (Kara, 2013; Hedrei-Helmer *et al.*, 2015) pour lequel une protéine de transport a aussi été identifiée « Prolonged depolarization afterpotential is not apparent » (PINTA) (Wang et Montell, 2005). Finalement, l'AR tout-*trans* et 9-*cis* ont aussi été identifiés dans des embryons de l'insecte *Locusta migratoria* (Nowickyj *et al.*, 2008).

#### 1.1.2.2 Fonctions physiologiques

L'existence d'une voie de signalisation qui pourrait impliquer l'AR chez les insectes a été longtemps contestée en attribuant uniquement les rétinoïdes à leurs fonctions dans les processus visuels. Cependant, la découverte et l'isolation d'un orthologue du

récepteur nucléaire RXR chez *Locusta migratoria* (LmRXR) répondant à l'AR tout-*trans* et 9-*cis* (Hayward *et al.*, 1999; Nowickyj *et al.*, 2008) renforce l'hypothèse d'une voie de signalisation des rétinoïdes chez les insectes. À ce propos, il a été postulé que RXR soit un partenaire du récepteur à l'ecdysone (EcR), un récepteur nucléaire connu dans le développement des insectes (Bui-Göbbels, 2015).

À l'heure actuelle, les études portant sur les rétinoïdes chez les insectes se concentrent sur la fonction visuelle, mais déjà en 1993, l'équipe de Némec *et al.*, (1993) démontrait qu'un excès d'AR pouvait empêcher la métamorphose chez trois espèces d'insectes (*Pyrrhocoris apterus*, *Decipifus cingulatus* et *Tenebrio molitor*). Plus récemment, des malformations développementales ont été démontrées chez la tique *Rhodnius prolixus* et chez *Drosophila melanogaster* suite à une exposition à l'AR (Nakamura *et al.*, 2007; Halme *et al.*, 2010). L'équipe de Sukiban *et al.* (2014) ont été les premiers à rapporter que l'AR 9-*cis* influencerait la neuritogénèse ainsi que la survie neuronale chez *Locusta migratoria*. Jusqu'à maintenant, cette étude est la seule qui s'est réellement intéressée à l'incidence de l'AR sur le développement du système nerveux chez les insectes. Bien qu'une exposition à l'AR puisse entraîner des malformations développementales chez les insectes, le rôle des rétinoïdes dans le développement de leur système nerveux demeure assez méconnu.

### 1.1.3 Biomarqueurs à base de rétinoïdes

Un biomarqueur est un changement observable ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique au caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). Ceci étant dit, sachant que des désordres minimes dans



les niveaux d'AR sont suffisants pour induire des malformations développementales importantes et que les rétinoïdes sont particulièrement sensibles aux processus d'oxydation, plusieurs mécanismes biologiques sensibles et finement régulés sont mis œuvre afin de contrôler son niveau (Rhinn et Dollé, 2012). En effet, un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) non neutralisé pourrait menacer l'intégrité de ces molécules. Les stratégies présentes pour limiter cette oxydation peuvent être de nature non enzymatique comme la captation d'ERO par les caroténoïdes, la vitamine C ou E ( $\alpha$ -tocophérol) ou de nature enzymatique. Parmi les enzymes, on distingue la catalase, la superoxide dismutase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. Dans un contexte où la réponse antioxydante est surchargée, l'oxydation de composantes cellulaires ou la présence de molécules antioxydantes pourrait être mesurée à des fins de suivi de la santé des populations.

Par ailleurs, puisque les rétinoïdes proviennent majoritairement de l'alimentation, les niveaux de ces composantes intègrent aussi une dynamique alimentaire et d'accès aux ressources. Pour cette raison, il est légitime et pertinent de s'intéresser aussi à leurs précurseurs caroténoïdes dans le cadre d'évaluation de la santé en suivi environnemental. L'étude du métabolisme des rétinoïdes (activité enzymatique ou expression génétique d'enzymes et de protéines de liaison), ainsi que les niveaux des rétinoïdes dans l'organisme et de leurs protéines de liaison sont donc des paramètres pertinents à étudier afin de détecter les désordres précoces, et ce, avant même d'entraîner des effets délétères au niveau de la santé des individus et des populations. En effet, par le passé, les niveaux de rétinoïdes et des caroténoïdes ainsi que l'activité enzymatique de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes ont été mis à contribution chez des espèces vertébrées (poissons, amphibiens et oiseaux) et utilisé comme biomarqueurs dans des contextes de contamination environnementale (Campbell *et al.*, 2004).



## 1.2 Contaminants agricoles

### 1.2.1 Néonicotinoïdes

Entre les années 1985 et 1995, plusieurs insecticides appelés néonicotinoïdes ont fait leur apparition sur le marché. De 1990 à 2008, ces produits de synthèse (chimiquement semblables à la nicotine) se sont hissés au premier rang de la vente mondiale des insecticides. Leur ascension rapide dans le secteur phytosanitaire a marqué l'ouverture d'un nouveau marché destiné à l'enrobage de semences. Ce dernier, entre 1990 et 2008, est passé de 155 à 927 millions d'euros et était constitué à 80% de ventes d'insecticides néonicotinoïdes (Jeschke *et al.*, 2011).

Actuellement, parmi les 7 insecticides néonicotinoïdes disponibles sur le marché (IMI, THM, CLO, thiaclopride, acétamipride, dinétofurane et nitenpyrame), 3 sont homologués pour la plupart des cultures (oléagineux, grains, légumineuses, fruits, légumes, cultures de serre, etc.), soit l'IMI, le THM et la CLO (Schaafsma *et al.*, 2015). Ils sont vendus et utilisés sous leurs formulations commerciales dans lesquelles sont ajoutés plusieurs surfactants dans le but d'améliorer l'efficacité des ingrédients actifs. En ce qui a trait à leur utilisation, plus de 60% de ces produits sont appliqués en enrobage de semences et en traitement au sol, mais ils sont aussi homologués au Canada pour l'aspersion foliaire. Une fois pénétré dans la plantule, l'insecticide systémique se distribue dans les tissus et la protège ainsi contre certains ravageurs (Jeschke *et al.*, 2011).

### 1.2.1.1 Préoccupation toxicologique

Au Québec, la presque totalité des semences de maïs et environ 50% de celles de soya sont enrobées avec des néonicotinoïdes (Parent, 2011). Lorsque les semences sont traitées avec ces insecticides à l'extérieur du Québec, elles ne sont pas considérées comme produits phytosanitaires, et donc, ne sont pas réglementées par la Loi sur les pesticides. De ce fait, le suivi de la vente et de l'utilisation de ces insecticides sont difficiles à estimer au Québec (Giroux, 2015).

Au courant des dernières années, plusieurs programmes de suivi environnementaux et de nombreuses études ont rapporté la présence de ces insecticides dans divers compartiments des écosystèmes, notamment dans le sol et dans l'eau. Dans les faits, les niveaux de néonicotinoïdes retrouvés dans les sols semblent varier grandement en fonction du temps après le dernier traitement. Huit mois après le dernier traitement à l'IMI, les niveaux décelés peuvent varier de 12,7 – 17,8 µg/kg (Schmuck *et al.*, 2001). Dans des sols où de 1 à 3 ans se sont écoulés après les derniers traitements, des concentrations de 0,09 – 10,7 µg/kg d'IMI, 0,02-1,5 µg/kg de THM et 0,02-13,6 µg/kg de CLO ont été retrouvés dans cette matrice (Jones *et al.*, 2014). Effectivement, avec des demi-vies variant dans les sols entre 28 à 1250 jours pour l'IMI, 7 à 3001 jours pour le THM et 148 à 6931 jours pour la CLO, une accumulation pourrait se produire (Goulson, 2013). Avec la popularité grandissante des insecticides néonicotinoïdes au Québec, la province s'est ainsi dotée de programmes de suivi environnementaux dans le but de déceler leur présence dans les cours d'eau. Dans des rivières du Québec drainant des régions où prédominent les cultures de maïs et de soja, des concentrations considérables de néonicotinoïdes sont retrouvées, notamment pour l'IMI (0,001 à 0,028 µg/L), le THM (0,002 à 0,59 µg/L) et la CLO (0,002 à 0,42 µg/L)

(I. Giroux, comm. pers; Giroux, 2015). En Ontario, pour des rivières à vocation similaire, des moyennes de 1,12 µg/L de THM et 2,28 µg/L de CLO ont été retrouvées (Schaafsma *et al.*, 2015). Ces résultats sont assez préoccupants compte tenu du fait qu'ils dépassent fréquemment le critère de vie aquatique chronique fixé au Québec (CVAC) de 0,0083 µg/L; un seuil établi au-dessus duquel des désordres pourraient subvenir au sein de toutes les populations d'organismes aquatiques ainsi que leur progéniture. Certains néonicotinoïdes ont aussi été détectés dans le pollen et le nectar. L'IMI a été détecté dans le pollen (maïs et tournesol) à des concentrations variant entre 2,1 et 3,0 µg/kg (jusqu'à 18 µg/kg) ou dans le nectar de tournesol avec des moyennes de 1,9 µg/kg (Schmuck *et al.*, 2001; Bonmatin *et al.*, 2005). Le THM et la CLO ont aussi été détectés dans le pollen de maïs à des concentrations moyennes respectives de 1,7 et 3,9 µg/kg (Krupke *et al.*, 2012). Il va sans dire que la présence de ces composés dans plusieurs compartiments des écosystèmes a soulevé des inquiétudes face à l'exposition d'espèces non ciblées.

### 1.2.2 Éléments traces métalliques

Bien que les ÉTM soient généralement retrouvés en faibles concentrations dans les sols, leurs concentrations peuvent varier en fonction de la composition géologique et la formation de ces derniers. Contrairement à certains ÉTM essentiels (Cu, Zn, Fe, Mn et Co) en faibles concentrations pour de nombreux processus physiologiques chez les plantes et les animaux, d'autres peuvent, aussi à faibles concentrations, entraîner des effets délétères (Pb, As, Cd, Hg, Sb, Sn, Se, Cr et Ba). Les pratiques agricoles comme l'utilisation répétée de fongicides ou de fertilisants chimiques contenant des métaux, et l'épandage de biosolides issus du traitement des eaux usées augmentent considérablement les teneurs en ÉTM dans les agroécosystèmes. Une fois dans le sol,



la dynamique de ces éléments peut varier considérablement selon les caractéristiques physicochimiques du sol et la spéciation de l'élément (He *et al.*, 2005).

Au Québec, l'épandage de boues d'épuration dans les champs agricoles est une pratique de valorisation agronomique fréquemment utilisée à des fins de fertilisation. Une étude menée par l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) soutenue par le ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ) et Agriculture et agroalimentaire Canada (AAC) souligne qu'une utilisation de fertilisants tels que les boues d'épuration ou le lisier de porc peut entraîner une accumulation d'ÉTM dans les sols agricoles comme c'est le cas avec le Cu et le Zn (Giroux *et al.*, 2008). Ainsi, sachant d'une part que ces éléments inorganiques ne sont pas dégradables et d'autre part qu'ils peuvent être disséminés dans plusieurs compartiments (eau, sol, plantes, etc.), certains éléments (As, Cd, Cr, Co, Cu, Mo, Pb, Se, Zn ainsi que le Hg) sont mesurés dans les boues avant l'épandage afin de limiter leur entrée dans les sols agricoles (Hébert, 2015). Au sein de ces ÉTM, l'As, le Cd, le Pb et le Cr figurent parmi les plus préoccupants pour la santé publique. Malgré ces mesures visant à protéger la santé humaine, certains éléments toxiques comme l'Al, le Pb et le Cd peuvent tout de même se retrouver dans différents compartiments environnementaux et ainsi nuire à la santé de certaines populations animales et végétales. Dans certains sols agricoles du sud du Québec, Saint-Laurent *et al.* (2010) ont mesuré des concentrations moyennes d'Al et de Pb de 10,8 et 13,0 mg/kg. Effectivement, chez une espèce de pois (*Anisacanthus linearis*) cultivée sur un sol contaminé en Cd (5,0 mg/kg), le contenu en Cd dans le pollen (450 mg/kg) était 5 fois plus élevé que la concentration retrouvée dans la fleur (Henson *et al.*, 2013). Des variations saisonnières de Pb (0,285-0,497 mg/kg) ont aussi été observées dans le pollen amassé par les abeilles dans l'ouest de la France (Lambert *et al.*, 2012).

Finalement, dans certains états du sud du Brésil, des concentrations d'Al allant jusqu'à 315 mg/kg ont été retrouvées dans du pollen d'abeille (Morgano *et al.*, 2010).

Afin de réduire la biodisponibilité des métaux dans un compartiment cellulaire, la plupart des organismes vivants synthétisent des protéines de faible poids moléculaire, les métallothionéines (MTs). La présence de plusieurs groupements "cystéine" dans ces protéines leur confère une forte affinité pour les ions métalliques. Chez l'abeille domestique, des protéines analogues aux MTs ont été identifiées par Badiou-Bénéteau *et al.* (2013). Ces auteurs présentent la variation des niveaux de MTLPs de l'abeille domestique comme potentiellement liée à la prévalence des métaux dans leur environnement.

### 1.2.3 Implication des contaminants agricoles dans la santé des abeilles

Étant donné la grande importance des pollinisateurs dans les rendements des cultures, le phénomène de surmortalité des abeilles domestiques a suscité de nombreuses recherches. Bien que la constatation des dommages sur la viabilité soit majoritairement faite en Europe et en Amérique du Nord, la documentation plutôt pauvre concernant les autres continents ne permet pas d'évaluer l'ampleur exacte du phénomène. Tout d'abord, contrairement au nombre de ruches gérées mondialement qui est en augmentation, une tendance bien différente se dessine pour l'Europe et les États-Unis qui ont enregistré respectivement des diminutions du nombre de ruches gérées de 26,5% et 49,5% entre 1961 et 2007 (van Engelsdorp et Meixner, 2010). En Amérique du Nord, les États-Unis compilent depuis quelques années des mortalités hivernales et annuelles jugées préoccupantes (<https://beeinformed.org/results/colony-loss-2014-2015-preliminary-results/>; consulté le 06/09/2016). Au Canada, malgré la mortalité



hivernale exceptionnellement basse cette année (16,4%), depuis 2007, le taux moyen oscillant autour de 25% est aussi au-dessus des niveaux acceptables ( $\leq 15\%$ ). Au Québec, la tendance est similaire à celle du Canada, mais l'Ontario présente un bilan qui contraste avec une mortalité hivernale moyenne d'environ 35% depuis 2007 (Kempers *et al.*, 2015).

Ces constats préoccupants ont entraîné une vague de projets de recherche traitant de la santé de l'abeille domestique et des pollinisateurs. Aujourd'hui, plusieurs facteurs potentiels ont été identifiés, mais l'utilisation massive et préventive d'insecticides néonicotinoïdes en agriculture est de plus en plus associée à ce phénomène et certaines évidences suggèrent une implication importante de ces produits.

Plusieurs routes d'expositions ont été documentées pour l'abeille domestique notamment la consommation de pollen et de nectar et le contact avec les poussières émises lors de l'ensemencement. Les abeilles entreraient aussi en contact avec les néonicotinoïdes lorsqu'ils sont aspergés sur le sol ou sur le feuillage (Krupke *et al.*, 2012). L'exposition des abeilles a ensuite été confirmée notamment avec les travaux de Chauzat *et al.* (2009) qui ont quantifié des concentrations moyennes d'IMI et d'un de ses métabolites dans le pollen, dans le miel et dans les tissus d'*A. mellifera* de 0,9  $\mu\text{g/kg}$  ; 0,7  $\mu\text{g/kg}$  et 1,2  $\mu\text{g/kg}$ , respectivement.

Des estimations des niveaux d'intoxication potentiels de différents stades d'abeille domestique suggèrent qu'avec une exposition à des concentrations entre 0,2 à 4,3 ng/abeille, des effets létaux et sous létaux sont susceptibles de se produire (Rortais *et al.*, 2005). La dose létale de l'IMI pour *Apis mellifera* varierait entre 3 et 41 ng/abeille. Considérant l'omniprésence de ces insecticides dans l'environnement

immédiat de l'abeille, il est légitime de croire que les abeilles se retrouvent exposées de façon chronique à ces composés.

Chez l'abeille domestique, plusieurs études ont documenté des effets potentiels entraînés par une exposition à des concentrations sous létales de néonicotinoïdes sur des paramètres associés au comportement. Parmi ceux-ci, les symptômes communément observés chez des abeilles intoxiquées sont des atteintes à la mobilité, aux capacités d'apprentissage, à l'orientation et à l'activité de butinage (Yang *et al.*, 2008; Mommaerts *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2012). Les études portant sur des bouleversements biochimiques sont plus rares. Ces effets relatent bien les potentielles implications des néonicotinoïdes dans la santé des populations d'abeilles, mais les études souvent courtes et utilisant des concentrations d'insecticides rarement retrouvées dans l'environnement limitent leur signification écotoxicologique.

La toxicité associée à certains ÉTM a été bien documentée par le passé relativement à la santé publique. Des altérations du fonctionnement cellulaire sont souvent rapportées en lien avec leur susceptibilité d'induire un stress oxydant dans un système biologique (Tchounwou *et al.*, 2012). Toutefois, les effets sous létaux potentiellement entraînés par la présence de faibles concentrations d'ÉTM chez les insectes sont peu documentés et généralement négligés dans les analyses de risque pour ces populations. Étant donné que les risques associés à la présence de métaux dans les agroécosystèmes sont mal connus, il serait tout indiqué d'investiguer les effets potentiellement entraînés par une telle exposition.

### 1.3 Aspects pertinents à des biomarqueurs du système nerveux

La présence d'une protéine ou l'intensité de l'activité d'une enzyme peuvent être utilisés comme des marqueurs de toxicité. L'activité de l'AChE est encore aujourd'hui un biomarqueur utilisé pour témoigner de l'exposition à des pesticides neurotoxiques comme les carbamates et les organophosphorés étant donné qu'ils ciblent cette enzyme. Son action est aussi modulée par plusieurs autres contaminants comme des métaux, ou des pyréthroïdes (Badiou *et al.*, 2008 ; Frasco *et al.*, 2016). Ici, l'activité de l'AChE est utilisée comme marqueur du fonctionnement du système cholinergique. Le système cholinergique des vertébrés mérite une attention particulière puisque plusieurs études font état de son débalancement à plusieurs niveaux chez l'humain dans des maladies comme l'autisme, la schizophrénie, le Parkinson ou l'Alzheimer que ce soit en lien avec les nAChRs (Deutsch *et al.*, 2010) ou l'activité de l'AChE (Meshorer et Soreq, 2006). Autrement, la présence de la reeline, une protéine clef dans le développement présente aussi plusieurs aspects intéressants pour le développement d'outils biomarqueurs qui sont détaillés dans l'appendice.

### 1.4 Objectifs et hypothèses

En considérant l'importance de la santé de l'abeille domestique et plus globalement celle des pollinisateurs en général et dans l'optique de mieux documenter les risques encourus par les populations de pollinisateurs en particulier, le but de ce travail était de documenter les désordres entraînés par une exposition chronique à certains contaminants agricoles (métaux et insecticides néonicotinoïdes) chez l'abeille



domestique à des concentrations retrouvées dans l'environnement. En tant que but secondaire, il était attendu d'évaluer le potentiel de l'abeille domestique en tant qu'espèce sentinelle dans un contexte de contamination agricole. Deux groupes de contaminants ont été sélectionnés, soit les insecticides néonicotinoïdes et les ÉTM. Finalement, il était attendu de mettre au point des tests de toxicité cellulaire sur la lignée cellulaire embryonnaire P19. Cette lignée cellulaire a été sélectionnée en tant que modèle issu de vertébré afin d'étendre la portée des résultats obtenus au niveau de la neurotoxicité et de la toxicité développementale suite à une exposition aux néonicotinoïdes selon des concentrations retrouvées dans l'environnement.

#### ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES (CHAPITRE 2) :

**Hypothèses :** Il était attendu qu'une exposition chronique à ces ÉTM (Cd, Al, et Pb) induise un stress oxydatif (et donc une augmentation de la peroxydation des lipides et une diminution de l' $\alpha$ -tocophérol) et une augmentation de la production des MTLPs.

**Objectif 1 :** Statuer sur l'implication du Cd, de l'Al et du Pb à des concentrations retrouvées dans le pollen dans le phénomène de stress oxydant en ciblant un marqueur de ce stress (peroxydation des lipides) et les niveaux d' $\alpha$ -tocophérol à la suite d'une exposition chronique à ces contaminants chez l'abeille domestique.

**Objectif 2 :** Mesurer les effets potentiels du Cd, de l'Al et du Pb sur la production des MTLPs à la suite d'une exposition chronique à ces contaminants à des concentrations retrouvées dans le pollen.

#### INSECTICIDES NÉONICOTINOÏDES- Produit pur seulement (CHAPITRE 3) :

**Hypothèse :** Il était attendu que l'exposition chronique aux insecticides néonicotinoïdes induise un stress oxydatif (et donc une augmentation de la peroxydation des lipides et une diminution de l' $\alpha$ -tocophérol). En parallèle, il était attendu une diminution dans les niveaux de caroténoïdes se répercutant dans les



niveaux de rétinoïdes. Finalement, il était attendu une augmentation de l'activité de l'AChE.

**Objectif 3 :** Statuer sur l'implication de l'IMI, du THM et de la CLO à des concentrations retrouvées dans l'environnement dans le phénomène de stress oxydant en ciblant un marqueur de ce stress (peroxydation des lipides) et son système de défense non-enzymatique ( $\alpha$ -tocophérol et caroténoïdes) à la suite à une exposition chronique à ces contaminants chez l'abeille domestique.

**Objectif 4 :** Mesurer les effets potentiels d'une exposition chronique à l'IMI, au THM et à la CLO à des concentrations retrouvées dans l'environnement sur le métabolisme des caroténoïdes en rétinoïdes chez l'abeille domestique.

Sous-objectif : Afin d'atteindre cet objectif, faire la mise au point d'une méthode de quantification des rétinoïdes polaires chez l'abeille domestique grâce à la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP-UV).

**Objectif 5 :** Mesurer les effets potentiels d'une exposition chronique à l'IMI, au THM et la CLO à des concentrations retrouvées dans l'environnement sur l'activité de l'AChE du système nerveux central chez l'abeille domestique.

MISE AU POINT DES TESTS DE TOXICITÉ DES INSECTICIDES NÉONICOTINOÏDES SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE P19-Produits purs et formulations commerciales (APPENDICE A) :

**Objectif 6 :** Mettre au point une méthode d'expositions de la lignée cellulaire P19 à l'IMI, le THM et la CLO ainsi qu'une méthode de dosage de l'AChE.

Sous-objectif : Afin d'atteindre cet objectif, mettre au point le test MTT ainsi que d'estimer les fenêtres de concentrations sous létales de diméthyl sulfoxide (DMSO) et d'insecticides (produit pur et formulation commerciale) en vue de faire les expositions.

## CHAPITRE II

### LOW DIETARY LEVELS OF AL, PB AND CD MAY AFFECT THE NON-ENZYMATIC ANTIOXIDANT CAPACITY IN CAGED HONEYBEES (APIS MELLIFERA)

Maxime Gauthier, Philippe Aras, Catherine Jumarie, et Monique Boily

*Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8*

Contribution personnelle : Expérimentation (broyage des échantillons pour analyses, quantification de l'alpha-tocophérol par CLHP-UV), Rédaction (Matériel et méthode, résultats textuels, résumé et conclusion. Révision et correction de toutes les sections), Recherche bibliographique légère pour introduction et discussion. Soumission de l'article et révision des commentaires pour re-soumission.

#### Article publié

Gauthier, M., Aras, P., Jumarie, C., and Boily, M. (2015). Low dietary levels of Al, Pb and Cd may affect the non-enzymatic antioxidant capacity in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Chemosphere*, 144, 848–854.

## 2.1 Abstract

Several hypotheses have been proposed to explain the abnormally high mortality rate observed in bee populations in Europe and North America. While studies based on the effects of pesticides are paramount, the metals present in agroecosystems are often overlooked. Sources of metals are linked to the nature of soils and to agricultural practices, namely the use of natural or chemical nutrients as well as residual materials from waste-water treatment sludge. The aim of this study was to investigate the effects of metals on honey bees exposed for 10 days to environmentally realistic concentrations of Al, Pb and Cd (dissolved in syrup). The monitoring of syrup consumption combined with the quantification of metals in bees revealed the following order for metal bioconcentration ratios: Cd > Pb > Al.  $\alpha$ -tocopherol, metallothionein-like proteins (MTLPs) and lipid peroxidation were quantified. When bees were exposed to increasing amounts of Cd, a marked augmentation of MTLPs levels was found. Lead (Pb) and Cd caused an increase in  $\alpha$ -tocopherol content, while alteration of lipid peroxidation was observed only with Al exposure. These findings raise concerns about the bioavailability and the additional threat posed by metals for pollinators in agricultural areas while providing new insights for potential use of the honey bee as a sentinel species for metal exposure.

(213 words)

Key words:

*Apis mellifera*, Metals,  $\alpha$ -tocopherol TBARS, MT



## 2.2 Introduction

In Europe and North America, honey bee mortality has made headlines. For the last ten years, the average winter loss of honey bee colonies in Canada (25%) exceeded the value of 15% considered acceptable ([http://www.agrireseau.qc.ca/documents/Document\\_88858.pdf](http://www.agrireseau.qc.ca/documents/Document_88858.pdf)). It is believed that the causes for honey bee mortality would be multifactorial, including the adverse effects of pesticides and anthropogenic chemicals, poor nutrition, impaired quality of the environment, and pathogenic insults. Agricultural practices are of concern as agrochemicals have been shown to affect honey bees (Wu *et al.*, 2011; Boily *et al.*, 2013) but little is known about the potential effects of metals. In the province of Québec (Canada) in addition to natural and chemical fertilizers, land application of residual materials, namely biosolids (mainly municipal wastewater treatment sludge) is used as soil amendment to stimulate rooting. Application of biosolids used in agriculture depends on the soil characteristics and their metal content as they must meet safety criteria; however, this sludge represents a significant source of metals as it can contain up to 3 mg/kg cadmium (Cd) and 150 mg/kg lead (Pb) (MDDEP, 2012). It is not known whether these metal contents are in accordance with an optimal health status of pollinators, especially since the metals in soil are available to plants and crops and therefore to foraging bees.

Metal bioavailability and bioconcentration are well known in phytoremediation practices for which maize (*Zea mays*) proved to be very efficient. Cd has been shown to accumulate in all parts of the maize plant (Xu *et al.*, 2013). In the partridge pea (*Anisacanthus linearis*) grown in Cd-contaminated soil (5 mg/kg), metal content in the pollen was found to be 5 times higher (450 mg/kg) than the flower levels (Henson *et al.*, 2013). Also, depending on the season, 0.285 to 0.497 (mg/kg) Pb have been measured in pollen collected in apiaries from farms and urban landscapes in France

(Lambert *et al.*, 2012). Up to 315 mg/kg Al was found in bee pollen collected in the southeastern Brazil States (Morgano *et al.*, 2010). Pollen and plant matrices may therefore accumulate metal at very high levels that could be detrimental to pollinators. Consequently, since foraging bees are exposed to metals contained in pollen or nectar and are known to accumulate them, this species is considered a potential bioindicator (Perugini *et al.*, 2011 ; van der Steen *et al.*, 2012). So far, it is known that metals may induce oxidative stress, i.e., imbalance between the level of pro-oxidant species and antioxidative defense, resulting in lipid peroxidation (Puppel *et al.*, 2014) as observed in Caddisfly larvae *Hydropsyche exocellata* (Barata *et al.*, 2005) exposed to Cd. The latent long-term exposure of bees to metals deserves further investigation. A few mechanisms are known to protect organisms against metal oxidative damages. In vertebrates, tocopherols (vitamin E) are acquired from the diet and are absorbed in association with lipids. Once in the liver,  $\alpha$ -tocopherol is linked to  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ -TTP), and distributed into the bloodstream through lipoproteins (Combs, 2012). Due to its high affinity for  $\alpha$ -TTP,  $\alpha$ -tocopherol is positively discriminated (90%) over other tocopherols (Wu and Croft, 2007). In insects, tocopherols are recognized to scavenge free radicals (Felton and Summers, 1995) while metallothioneins (MTs) may limit the bioavailability of toxic metals. MTs are small proteins (6-10 kDa) that play a crucial role in metal homeostasis and detoxification (Hamer, 1986). Increased expression of MTs, a widespread and well-conserved protective mechanism against metal toxicity, has been characterized in *Drosophila* (Zhang *et al.*, 2001). MTs have not yet been annotated in *Apis mellifera*, and to our knowledge, there is only one study on metal induction of MTLPs in this species (Badiou-Bénéteau *et al.*, 2013). Considering the health status of pollinators and the reported toxicity of Al, Pb and Cd in insects, the main goal of this study was to investigate the honey bee's non-enzymatic antioxidant response following chronic exposure to these metals. More specifically,  $\alpha$ -tocopherol and MTLP levels and lipid peroxidation were quantified. Ultimately, an attempt was made to render a more representative picture of honey bees exposed to metals, and to demonstrate that their

oxidative response status and metal contents could be used as biomarkers to assess metal contamination in the environment.

## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Chemicals

Butylated hydroxytoluene (BHT), malondialdehyde (MDA),  $\alpha$ -tocopherol, antipain dihydrochloride, pepstatin A, Tris-(2-Carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid ammonium (SBD-F) and 2-thiobarbituric acid (TBA) were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, ON, Canada). Standard for metallothionein-1 from rabbit liver was from Enzo Life Science (Brockville, ON, Canada). Bovine serum albumin (BSA), ascorbic acid, sodium deoxycholate, trichloroacetic acid and sodium dodecyl sulfate were from Fisher Scientific (Saint-Laurent, QC, Canada). HPLC-grade solvents were used. Metals for bee exposure were used as chloride and dissolved in a sucrose solution. Cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) was purchased from Sigma-Aldrich Ltd., and Pb ( $\text{PbCl}_2$ ) and Al ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) were obtained from VWR International (Radnor, PA, USA).

### 2.3.2 Honey bee exposure

Cage exposure was based on a previous experiment that followed the Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) protocol (Hedrei-Helmer *et al.*, 2015). The exposure levels were based on the metal concentrations measured in pollen from maize fields collected in 2012. Maize was selected since the pollen available during shedding time is quite abundant and there is accumulating evidence that honey bees feed on maize pollen in absence of more rewarding crops or flowers (Keller *et al.*, 2015). Maize pollen is potentially contaminated with metals due to field treatments with manure and municipal sludge. Chemical analyses revealed



concentrations ranging from 35 to 670 mg/kg for aluminum (Al); 0.035 to 0.5 mg/kg for lead (Pb); and from 0.01 to 0.024 mg/kg for cadmium (Cd). Nominal concentrations in syrup (sucrose solution, 50% w/w) were the following: 20, 50, 70 and 130 ppm for Al; 0.05, 0.15 and 0.30 ppm for Pb; and 0.005, 0.015 and 0.03 ppm (thereafter referred as mg/L) for Cd. Control cages were supplied with sucrose solution only. The honey bees (from the same beehive) were collected from frames without brood during the summer of 2013 for exposure to NaCl (July 1 to 11), Cd (July 15 to 27), Pb (August 9 to 19) and Al (August 25 to September 4). Each concentration and the control syrup were tested with five cage replicates (150 bees/concentration). Prior to metal ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{PbCl}_2$  and  $\text{CdCl}_2$ ) exposures, chloride (NaCl) was tested for its toxicity using the following concentrations: 10, 100, 500 and 1000 (mg/L). For this experiment, control and salt-contaminated syrups were tested with three cage replicates (90 bees/concentration). The control and metal-contaminated sugar solutions were prepared about 10 days prior to exposure, stored at 20°C, and thawed at room temperature before use. The sugar solutions of all cages (five replicates per dose and controls) were changed daily for the duration of the 10-day test. Each cage was equipped with two feeders for syrup (1.5-ml capacity each). These were weighed before and after daily changes to estimate the consumption of syrup per cage/day adjusted for dead bees. Mortality was recorded every 24 h. After 10 days, the surviving bees were anesthetized/ euthanized by placing the cages in an insulated container with dry ice for 5 min and stored at -80°C until analysis. Pools of bees (randomly mixed between replicates for each dose of contaminant) were analyzed for  $\alpha$ -tocopherol, peroxidation of lipids, MTLPs, and protein content.

### 2.3.3 Metal content analyses

Metal concentrations in contaminated syrup as well as levels in bees were verified by chemical analysis by the Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ, QC, Canada). In all cases, the metal content in syrup fell within the 90%



confidence interval of the nominal concentration. No Al, Pb or Cd was detected in controls syrup. The pools of bees (one pool of 6 bees per dose) were lyophilized and tissues were digested in a microwave oven (195°C, 15 min) with both HNO<sub>3</sub> and HCl acids (3:1) along with blanks and certified reference samples (lobster hepatopancreas reference material for trace metal, TORT-2 and Fish Protein Certified Reference Material for Trace Metals, DORM-3, National Research Council of Canada). Samples were allowed to cool for 30 min and metals were measured by ICP-MS.

#### 2.3.4 Tissue preparation

Eight whole bees were weighed, rinsed with 100% acetone and homogenized on ice in a glass tube (12-ml screw top borosilicate) with four volumes of daily fresh homogenization solution pH 7.5 (PBS containing 0.05 mM antipain, 5 mM pepstatin A and 0.5% ascorbic acid). This single extraction was used for all subsequent analyzes. A volume of 1.5 ml of the homogenate was transferred into a second 12-ml glass tube and kept on ice for  $\alpha$ -tocopherol analysis. The remaining homogenate was centrifuged at 4°C, 9600 x g for 10 min and the supernatant was aliquoted (200  $\mu$ l) and frozen at - 80°C for subsequent lipid peroxidation, MTLp, and protein content measurements. Up to 17 pools of 8 bees were prepared for each concentration of metal tested and the control group.

#### 2.3.5 Alpha-tocopherol analysis

Homogenate (1.5 ml) (see Section 2.3.4) was mixed with 1 ml of MeOH (0.1% BHT), vortexed for 30 s, and extracted three times with hexane (0.1% BHT): acetone (50:50) with 4 ml for the first extraction, and 3 ml for the second and third extractions. After each addition of the hexane: acetone solution, the tube was vortexed for 90 s and centrifuged for 5 min at 1625 x g. The supernatant (1.7 ml) was collected and distributed evenly between two 5-ml disposable glass tubes and evaporated to dryness

for 10 min in a vacufuge (Eppendorf™, Fisher Scientific, Ottawa, Canada) at 45°C. This procedure was repeated with the second extraction (1.5 ml) and the third extraction (1.7 ml). The  $\alpha$ -tocopherol was detected at 292 nm using the chromatographic method described in Hedrei-Helmer *et al.*, (2015). The retention time was 14.6 min and the peak was identified with a commercial standard

#### 2.3.6 TBARS analysis (lipid peroxidation)

The measurement of oxidative stress was evaluated as presented in Hedrei-Helmer *et al.*, (2015) from previously generated homogenates (see Section 2.3.4).

#### 2.3.7 Metallothionein-like proteins (MTLPs) analysis

The MT quantification was adapted from a method developed for the earthworm and using a fluorescent tag (SBD-F) (Ndayibagira *et al.*, 2007). Aliquots previously generated (see Section 2.3.4) of approximately 250  $\mu$ l were thawed on ice, heated in water (80°C) for 2 min, and cooled immediately on ice for 10 min. After a 10-min centrifugation (3500  $\times$  g), 50  $\mu$ l of the supernatant was collected and transferred to a 1.5 ml vial along with 150  $\mu$ l of the derivatization buffer, so the final concentrations were: 20 mM EDTA, 2.5 mM TCEP, 2mM SBD-F, 0.66 M boric acid and 0.05 M KOH. The derivating matrix was vortexed and incubated in a 50°C water bath. After a 30-min incubation period, 25  $\mu$ l of HCl (4 M) were added and the derivatized sample was vortexed and kept on ice until injection. Before injection, 50  $\mu$ l of the derivatized matrix was combined with 1  $\mu$ l of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer, and 50  $\mu$ l of the resulting mixture was injected into the HPLC system. The system used was the same as described for carotenoid analysis equipped with an Ace C18 analytical column, 250 mm  $\times$  4.4 mm, 5  $\mu$ m, and an isocratic elution was performed with K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.4) (20 mM):ACN:MeOH (80:18:2). The flow rate was 0.5 ml/min and the UV detector was set at 370 nm. Under these conditions, the derivatized MTLPs eluted at 7.1 min. The total elution time was 10 min. The MTLP contents in the samples were

determined according to a standard curve produced by SBD-F derivatization of known amounts of rabbit liver MT-1 and are expressed as MTLPs mg/g of tissue.

#### 2.3.8 Protein concentration

The protein content in each sample (supernatants obtained following the first centrifugation of homogenates) was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

#### 2.3.9 Statistical analysis

For chloride and each metal, the survival of bees after 10 days was compared using pairwise Kaplan-Meier analysis. When significant, each survival curve was compared with the control group (2 x 2 design) and significance threshold adjusted from Bonferroni correction ( $p/k$ : 0.05/number of comparisons). Survival was defined as the number of bees at day 1 minus the survival bees at day 10 and is expressed as a percentage relative to day 1. Consumption of syrup was tested using general linear model (GLM) two-way repeated measures (time and treatment design including a “time x treatment” interaction term). Mean retentions of each metal (total uptake minus control values X 100) were compared with Kruskal-Wallis (KW) non-parametric tests. Mean concentrations of  $\alpha$ -tocopherol, TBARS, MTLPs (except for chloride), protein, and bee mass were compared for Al, Pb and Cd by GLM one-way analysis of variance, followed by the Dunnett  $t$  post hoc test against the control group. All statistical tests were performed with SPSS® Statistic 18.0 software (IBM® Corporation, Armonk, NY, USA).



## 2.4 Results and discussion

Caged bee survival was tested for each metal and chloride after 10 days of exposure. When compared with their respective control group, lower significant results were found only for chloride ( $\chi^2 = 35.5$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0.001$ ) and Al ( $\chi^2 = 31.1$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0.001$ ) (Table 2.1). Chlorine 10 mg/L was statistically different from all other concentrations and for this group, mortalities occurred mainly during the first two days. When survival curves were compared from day 3 to day 10, the model was no longer significant ( $\chi^2 = 6.9$ ;  $df = 4$ ;  $p = 0.14$ ). We associated these early fatalities with the stress of being separated from the hive. For Al 20 mg/L, most deaths occurred on day 6 but survival has stabilized thereafter. When all control groups were compared for survival, chloride and Cd were statistically lower than Al and Pb ( $\chi^2 = 24.8$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0.001$ ). This result may be due to the fact that exposures to chloride and Cd occurred in July whereas exposures to Al and Pb were held in August reflecting some changes in the experimental hive. Taking into account that no relationship was found between survival and the increasing amounts of chloride or metals, we concluded that the survival results could hardly be related to contaminants.

Syrup consumption varied slightly along the 10-day exposure, but overall, no significant differences were found between treatments and time including the interaction term 'treatment x time' ensuring the 'non-repellent' character of the mixtures. From the cumulative syrup consumption for the 10-day exposure, and given the syrup metal concentration, we calculated the total metal intake related to contaminated syrup. These data allowed us to estimate metal bioconcentration ratios (bee metal content/syrup metal content), and to quantify metal retention by bees after the 10-day exposure (bee metal content/total amount of ingested metal). As shown in Fig. 2.1, bee metal content (open bars) increased as a function of the metal level in the syrup, except for two concentrations. First, unexpected high Al contents were measured in bees fed with 50 mg/L. This would not be related to the bees' contamination from



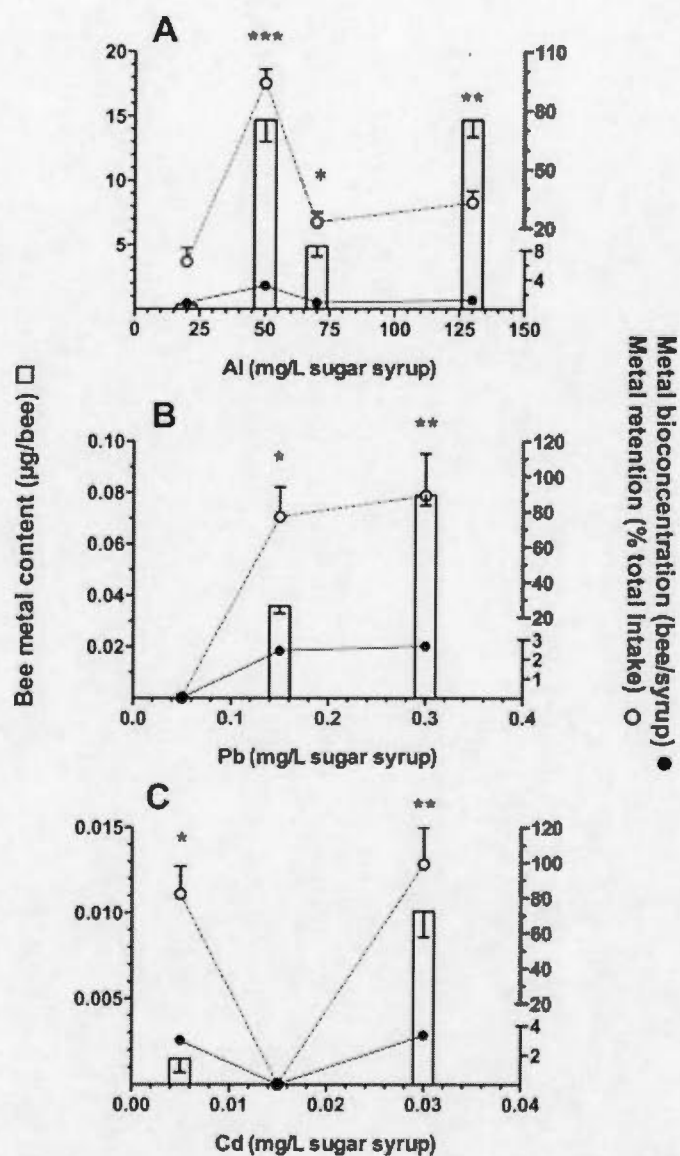
**Table 2.1** Survival, mass, protein and tocopherol (means  $\pm$  SD) measured in honey bees exposed for 10 days to increasing concentrations of chloride, Al, Pb or Cd

Metal (mg/L sugar syrup)	(n)	Survival (%)	Bee mass (g/10 bees)	Protein (mg/g tissue)	$\alpha$ -tocopherol (ng/g tissue)
Chloride					
0	(9)	90.7 $\pm$ 4.6	1.14 $\pm$ 0.05	243 $\pm$ 22	27.5 $\pm$ 8.4
10	(7)	74.3 $\pm$ 10.6***	1.13 $\pm$ 0.03	270 $\pm$ 36	27.4 $\pm$ 4.3
100	(9)	86.9 $\pm$ 5.5	1.17 $\pm$ 0.08	235 $\pm$ 22	19.4 $\pm$ 4.8
500	(10)	92.5 $\pm$ 6.6	1.15 $\pm$ 0.07	256 $\pm$ 31	19.5 $\pm$ 2.5
1500	(7)	97.4 $\pm$ 2.1	1.13 $\pm$ 0.05	264 $\pm$ 30	25.7 $\pm$ 11.4
Al					
0	(17)	99.6 $\pm$ 0.4	1.09 $\pm$ 0.11	253 $\pm$ 17	203 $\pm$ 42.0
20	(16)	96.7 $\pm$ 2.6**	1.06 $\pm$ 0.06	249 $\pm$ 15	211 $\pm$ 45.7
50	(17)	100 $\pm$ 0.00	1.09 $\pm$ 0.09	261 $\pm$ 27	188 $\pm$ 47.6
70	(17)	100 $\pm$ 0.00	1.07 $\pm$ 0.06	263 $\pm$ 23	218 $\pm$ 63.1
130	(16)	99.6 $\pm$ 0.4	1.15 $\pm$ 0.06	246 $\pm$ 16	192 $\pm$ 33.6
Pb					
0	(13)	96.9 $\pm$ 2.2	1.00 $\pm$ 0.05	251 $\pm$ 16	36.1 $\pm$ 7.8
0.05	(12)	98.5 $\pm$ 1.0	1.01 $\pm$ 0.07	246 $\pm$ 14	52.1 $\pm$ 14.2**
0.15	(12)	96.1 $\pm$ 2.9	1.03 $\pm$ 0.08	254 $\pm$ 21	43.4 $\pm$ 8.6
0.30	(14)	97.2 $\pm$ 2.2	1.04 $\pm$ 0.07	260 $\pm$ 25	44.1 $\pm$ 16.5
Cd					
0	(11)	95.1 $\pm$ 4.6	1.21 $\pm$ 0.08	262 $\pm$ 27	22.6 $\pm$ 4.2
0.005	(14)	97.8 $\pm$ 2.4	1.20 $\pm$ 0.05	280 $\pm$ 22	26.8 $\pm$ 3.7
0.015	(13)	97.2 $\pm$ 2.2	1.19 $\pm$ 0.06	272 $\pm$ 31	26.1 $\pm$ 3.1
0.030	(12)	93.3 $\pm$ 5.6	1.19 $\pm$ 0.05	271 $\pm$ 17	29.8 $\pm$ 2.8*

\*\*\* $p$ <0.01 \*\* $p$ <0.05 \* $p$ <0.01 Chi-square (Log-rank Mentel-Cox)

\* $p$ <0.05 \*\* $p$ <0.01 GLM one-way analysis of variance followed by Dunnett  $t$  test





**Figure 2.1** Means  $\pm$  SD of bee metal content (mg/bee, bars), metal bioconcentration ratio (bee/syrup, black circles) and metal retention (% total intake, open circles) based on syrup consumption after 10-day exposure. A) Al. B) Pb. C) Cd. Mean retentions of each metal were compared with Kruskal-Wallis (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001)





sources other than syrup since all the bees used for the experiment with Al were captured at the same time. The 50 mg/L Al concentration may represent a toxicity threshold for bees in terms of metal content and retention. To confirm this, future exposures with concentrations between 0 and 50 mg/L could be performed. Also, we noted that bees fed with 0.015 mg/L Cd did not accumulate metal. Indeed, after correction for the Cd content measured in control bees ( $10.9 \pm 0.2$  ng/bee, i.e.,  $0.4 \pm 0.01$  mg/kg dw), metal levels in these bees were null, i.e., Cd contents were not significantly different from the metal level in the control bees. These results are difficult to explain, but the overall data presented in Fig. 2.1 clearly revealed that the bees handle Al, Pb and Cd differently. Bees do not seem to accumulate Al since a mean bioconcentration ratio of  $0.9 \pm 0.2$  was estimated for 20, 70, and 130 mg/L Al (Fig. 2.1, filled circles). In contrast, bioconcentration ratios of  $2.5 \pm 0.2$  and  $3.2 \pm 0.2$  were obtained for Pb and Cd, respectively. A number of studies have shown that bees foraging in contaminated areas may accumulate metals (Perugini *et al.*, 2011 ; van der Steen *et al.*, 2012). However, only caged bee studies conducted under well-controlled exposure conditions allow bioconcentration ratios to be computed. Our data revealed that after 10-day exposure, retention values (% total intake) for 50, 70 and 130 mg/L were significantly higher than the control value (KW = 23.3; df = 4;  $p < 0.001$ ) (Fig. 2.1, open circles). A dose-response relationship was observed for Al retention in bees (excluding data with 50 mg/L). Significant higher retention values for Pb over the control group were observed with 0.15 mg/L and 0.3 mg/L (KW = 17.3; df = 3;  $p < 0.01$ ) and for Cd, with 0.005 and 0.03 mg/L (KW = 17.5; df = 3;  $p < 0.01$ ). Pb and Cd were almost totally retained at concentrations above 0.05 mg/L. Indeed, after 10-day exposure to 20, 50 and 130 mg/L Al, 6, 23 and 33% (respectively) of the ingested metal was still present in the bees. (Fig. 2.1, open circles). No accumulation of Pb was noted with 0.05 mg/L, but 80 and 90% of the total ingested metal was recovered in bees exposed to 0.15 and 0.3 mg/L, respectively. Similarly, 80-99% of total metal intake was retained in bees exposed to 0.005 and 0.03 mg/L Cd. These

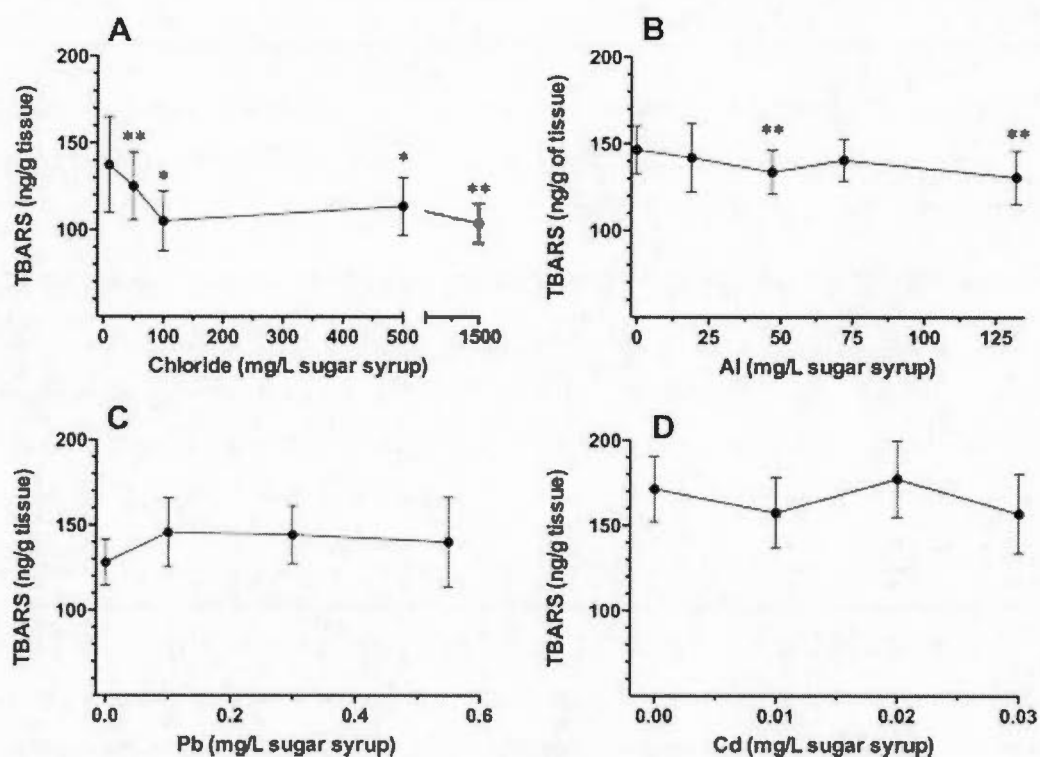
results suggest a lower absorption or a much higher capacity to eliminate Al compared to Cd and Pb, at least over a 10-day exposure.

No effects were noted following the exposure to increasing concentrations of chloride and the exposure to Al, Pb or Cd did not influence the mass or the protein content in contaminated bees when compared to their respective control group (Table 2.1). Exposure to Pb affected only the a-tocopherol levels; the values differed significantly between the control and treated groups ( $F_{3,44} = 3.17$ ,  $p < 0.05$ ). Values were higher for the treated groups than for the control group for all Pb concentrations but a true significant result could be found only for 0.05 mg/L. Similar results on  $\alpha$ -tocopherol were observed with Cd; a significant model was obtained ( $F_{3,45} = 4.84$ ,  $p < 0.05$ ) but only the value associated with the highest dose (0.03 mg/L) was significantly higher than the control. The levels of a-tocopherol may vary seasonally (Kara, 2013) and our data tend to support a seasonal effect. The control group values (Table 2.1) clearly indicate that bees captured in August (for Al exposure) had on average 10 times more a-tocopherol than any other group. However, it is very unlikely that the increasing  $\alpha$ -tocopherol levels observed in bees exposed to Pb and Cd can be attributed to seasonal variations; within the same exposure experiment, the bees were captured on the same day and randomly assigned to different treatments (control and increasing concentrations). Assuming that the regulatory mechanisms and elimination of insect  $\alpha$ -tocopherol are similar to what is known in vertebrates, we can therefore believe that Pb and Cd had a positive effect on a-tocopherol synthesis or that these metals interfered with the mechanisms to eliminate the a-tocopherol (P450 and  $\beta$ -oxidation), favoring its accumulation in tissues. Indeed, in mammals,  $\beta$ -oxidation processes were decreased by Al and Cd exposures (Alvarez *et al.*, 2007 ; Lemire *et al.*, 2011). In insect, a study by Parker and McCormick, (2005) shed some light on such mechanisms. By testing discrimination of  $\alpha$ -tocopherol in *Drosophila*, they found that P450  $\omega$ -hydroxylase cytochrome would have a similar role which, in mammals, is associated with the protein  $\alpha$ -TTP. While the regulation and metabolism of insect tocopherol remain to be

elucidated, its presence in tissue has been associated with increased longevity in the fly as well as sperm viability in the bee (Canavoso *et al.*, 2001), and the antioxidant properties of tocopherol have been recognized (Felton and Summers, 1995).

Results obtained for lipid peroxidation in bees fed with metal or chloride contaminated syrup are presented in Fig. 2.2. It is one of the principal types of oxidative damage and its measurement as a first “answer” allows an estimate of the oxidative stress in tissues (Piřacik *et al.*, 2002). Significant lower TBARS values were measured in bees exposed to chloride compared to those in their control group ( $F_{4,36} = 4,79$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2.2A). Significantly lower TBARS values compared to the control group ( $F_{4,76} = 3.02$ ,  $p < 0.05$ ) were also measured in the bees exposed to 50 mg/L and 130 mg/L Al (Fig. 2.2B). Considering the low TBARS values observed with 50 mg/L and higher levels of chloride, one would have expected similar results with exposure to Al (added as  $AlCl_3$  in the syrup), leading to similar levels of chloride. Compared to chloride conditions alone, feeding bees with the  $AlCl_3$ -contaminated syrup led to higher TBARS values, suggesting that Al does increase lipid peroxidation. Unlike the Al condition, Pb or Cd-contaminated syrup (added as  $PbCl_2$  and  $CdCl_2$ ) contained very low levels of chloride (less than 1 mg/L) and was not expected to influence TBARS values per se. As suggested by Zhang *et al.*, (2011) in the Chinese grasshopper *Oxya chinensis*, an increased MDA formation would have probably been observed with Cd tissue contents around 20-150 mg/kg dw, but the Cd tissue contents in our study of 0.7 mg/kg dw were insufficient to induce MDA formation. A number of studies have also shown variation in antioxidative enzyme activities in insects exposed to Cd, and revealed different effects at low or high Cd concentrations as well as different responses relative to the insect developmental stage (Zhang *et al.*, 2001; Mirćić *et al.*, 2013). Here we conclude that Pb and Cd levels used in the present study do not significantly increase lipid peroxidation (Fig. 2.2C and D). However, production of MDA is enhanced when unsaturated lipids are oxidized and is generally correlated with





**Figure 2.2** TBARS (ng/g of tissue) measured in bees exposed to increasing concentrations of chloride (A), Al (B), Pb (C) and Cd (D). Chloride or metal-treated bees were compared to the control group using GLM one-way analysis of variance followed by Dunnett *t* test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )

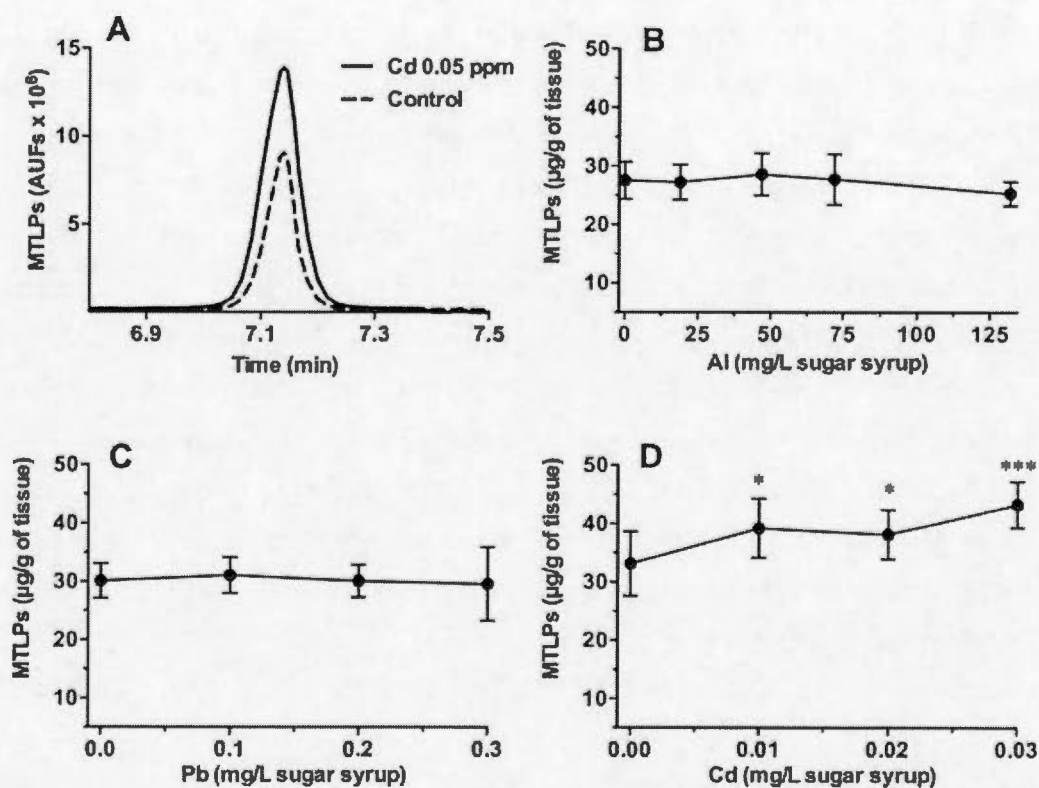


the presence of triglycerides. The lower TBARS values following chloride exposure could thus be related to decreased unsaturated lipid (triglyceride) levels. In future studies, special care should be taken to report TBARS values relative to triglyceride levels.

The HPLC method used proved to be suitable for measuring variation in MTLP levels as shown by the chromatogram in Fig. 2.3A. While exposure to Al (Fig. 2.3B) and Pb (Fig. 2.3C) did not influence the levels of MTLPs, exposure to Cd resulted in significant increases for all metal levels tested ( $F_{3,46} = 8.30$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2.3D). Recently Arambourou *et al.*, (2013) exposed chironomids to Pb (3.5-505.5 mg/kg) for 16 days and found a significant increase in MT and a metal accumulation in insect tissues beyond 500 mg/kg. In our study, the highest Pb concentration was 0.3 mg/kg and an accumulation of up to 0.08 mg/bee was observed. Therefore, concentrations of Pb combined with the 10-day exposure in our study might not have been sufficient to influence the honey bee's MTLPs. Another study conducted at La Reunion Island by Badiou-Bénéteau *et al.* (2013) reported higher MT levels in honey bees from an urban area compared to a semi-natural environment. This time, the levels of MT were 10-100 times higher than the values we measured in our study. Given the transient induction and expression of MTLPs, it is possible that caged bees exposed to one metal at a time showed much lower MTLP content than those exposed to a mixture of metals.

However, several exposures and methodological parameters make direct comparison difficult. Our protocol was limited to 10 days in the laboratory using one metal at a time whereas the study of Badiou-Bénéteau *et al.* (2013) lasted one year in natural environments in the presence of several organic and inorganic contaminants, and metal accumulation in bees was not measured. Moreover, several methodological differences must be considered notably instruments for detection and tissues selected for analysis.





**Figure 2.3** Metallothionein-like proteins (MTLPs) in honey bee after 10-day exposure to metals. A) Typical reverse phase HPLC chromatogram of MTLPs (mg/g of tissue) for honey bees exposed (solid line) or not (dashed line) to Cd (0.05 ppm). Means  $\pm$  SD of MTLPs contents after exposure to increasing concentrations of B) Al C) Pb and D) Cd. Metal-treated bees were compared to the control group using GLM one-way analysis of variance followed by Dunnett  $t$  test (\* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

## 2.5 Conclusion

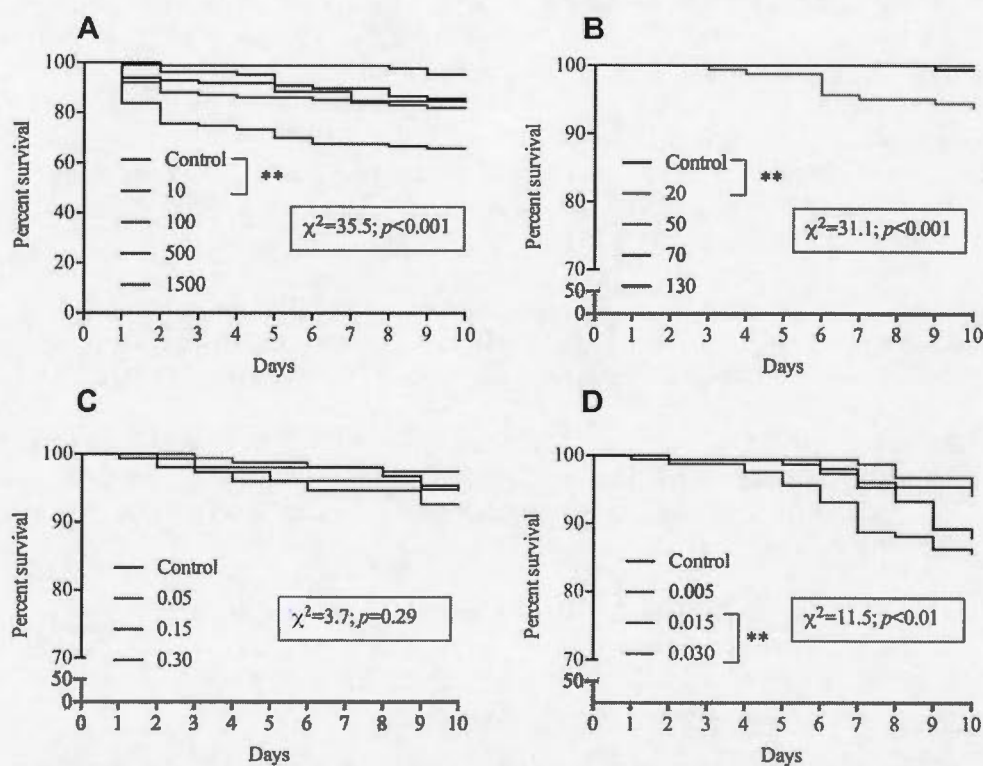
In this paper, it was shown that orally ingested metal at concentrations found in the environment altered the honey bee's components involved in antioxidative responses. Aluminum was shown to bioaccumulate less than Pb and Cd in *A. mellifera*, but was responsible for a higher lipid peroxidation. Over the 10 days of exposure, Cd and Pb were steadily accumulated in the bees and were both associated with higher  $\alpha$ -tocopherol levels. Cadmium demonstrated a clear MTLP increase at environmental concentrations. These results suggest that honey bees could be used as bio-indicator species for metal contamination, but more importantly they demonstrate the additional concern for pollinators foraging in metal-contaminated agroecosystems. At this point, we do not know the consequences of a longer-term exposure to Al, Pb or Cd used alone or in mixtures with other metals and contaminants, namely the actual conditions in agricultural areas. The diagnostic tools presented in this study will help to further research in this direction.

## 2.6 Acknowledgement

We are grateful to the Direction des matières dangereuses et des pesticides, Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les Changements Climatiques (MDDELCC) for metal analysis. We thank Nathalie Dassylva from CEAEQ (MDDELCC) for her valuable cooperation. The authors would like to thank Virginie Bérubé for developing MT analysis on bees and Isabelle Lecavalier-Mondor for the TBARS and MT analyses. This study was supported by a grant from the Programme de Soutien à l'Innovation en Agroalimentaire (PSIA) from Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) awarded to M. Boily (#811175).



## 2.7 Appendix A: Supplementary data



**Figure 2.4** Survivorship for honey bees exposed for 10 days to increasing concentrations (mg/L sugar syrup) of A) NaCl, B) Al, C) Pb and D) Cd. Survival curves were compared using pairwise Kaplan-Meier analysis (\*\*  $p < 0.01$ )

## 2.8 References

- Alvarez, S. M., Gómez, N. N., Scardapane, L., Fornés, M. W. and Giménez, M. S. (2007). Effects of chronic exposure to cadmium on prostate lipids and morphology. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 20(5), 727–41.
- Arambourou, H., Gismondi, E., Branchu, P. and Beisel, J.-N. (2013). Biochemical and morphological responses in Chironomus riparius (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to lead-spiked sediment. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 32(11), 2558–64.
- Badiou-Bénéteau, A., Benneveau, A., G  ret, F., Delatte, H., Becker, N., Brunet, J. L., Reynaud, B. and Belzunces, L. P. (2013). Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environment international*, 60, 31–41.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escal  , M., Prat, N. and Porte, C. (2005). Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae Hydropsyche exocellata from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology*, 74(1), 3–19.
- Boily, M., Sarrasin, B., Deblois, C., Aras, P. and Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (Apis mellifera) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental science and pollution research international*, 20(8), 5603–14.
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Canavoso, E., Jouni, Z. E., Karnas, K. J., James, E. and Wells, M. A. (2001). Fat metabolism in insects. *Annual review in nutrition*, 21, 23–46.
- Combs, G., 2012. The vitamins, 4rth edition. Elsevier, 570 pages.
- Felton, G. W. and Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 29, 187–197.
- Hamer, D. H. (1986). Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 913–951.
- Hedrei-Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C. and Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation

and diet-derived antioxidants in caged honey bees (Apis mellifera).  
*Environmental science and pollution research international*, 22, 8010–8021.

Henson, T. M., Cory, W. and Rutter, M. T. (2013). Extensive Variation in Cadmium Tolerance and Accumulation among Populations of Chamaecrista fasciculata. *PLoS ONE*, 8(5), e63200.

Kara, T. (2013). Seasonal variation of vitamin and sterol content in chironomidae larvae. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(22), 1579–1583.

Keller, I., Fluri, P. and Imdorf, A. (2015). Pollen nutrition and colony development in honey bees: part 1. *Bee World*, 86(1), 3–10.

Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Larhantec, M., Delbac, F. and Pouliquen, H. (2012). Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution*, 170, 254–259.

Lemire, J., Mailloux, R., Darwich, R., Auger, C. and Appanna, V. D. (2011). The disruption of L-carnitine metabolism by aluminum toxicity and oxidative stress promotes dyslipidemia in human astrocytic and hepatic cells. *Toxicology letters*, 203(3), 219–26.

MDDEP (Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs) 2012. Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes : critères de références et normes réglementaires. 170 pages

Mirčić, D., Blagojević, D., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M. and Lazarević, J. (2013). Cadmium effects on the fitness-related traits and antioxidative defense of Lymantria dispar L. larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(1), 209–218.

Morgano, M., Teixeira Martins, M. C., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Yotsuyanagi, K. and Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Inorganic contaminants in bee pollen from southeastern Brazil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11), 6876–83.

Ndayibagira, A., Sunahara, G. I. and Yves Robidoux, P. (2007). Rapid isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm Eisenia andrei. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 194–201.



- Parker, R. S. and McCormick, C. C. (2005). Selective accumulation of  $\alpha$ -tocopherol in *Drosophila* is associated with cytochrome P450 tocopherol- $\omega$ -hydroxylase activity but not  $\alpha$ -tocopherol transfer protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(3), 1537–1541.
- Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M. C., Tarasco, R. and Amorena, M. (2011). Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biological trace element research*, 140(2), 170–6.
- Piłacik, B., Nofer, T. W. and Wąsowicz, W. (2002). F2-isoprostanes biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluation of oxidative stress induced by oxic agents. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 15(1), 19–27.
- Puppel, K., Kapusta, A. and Kuczyńska, B. (2014). The etiology of oxidative stress in the various species of animals, a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2179–2184.
- van der Steen, J. J. M., de Kraker, J. and Grotenhuis, T. (2012). Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.). *Environmental monitoring and assessment*, 184(7), 4119–26.
- Wu, J. H. and Croft, K. D. (2007). Vitamin E metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5-6), 437–452.
- Wu, J. Y., Anelli, C. M. and Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.
- Xu, W., Lu, G., Dang, Z., Liao, C., Chen, Q. and Yi, X. (2013). Uptake and Distribution of Cd in Sweet Maize Grown on Contaminated Soils : A Field-Scale Study. *Bioinorganic Chemistry and Applications* (-), 1–8.
- Zhang, B. O., Egli, D., Georgiev, O. and Schaffner, W. (2001). The *Drosophila* Homolog of Mammalian Zinc Finger Factor MTF-1 Activates Transcription in Response to Heavy Metals, *Molecular and cellular biology* 21(14), 4505–4514.
- Zhang, Y., Sun, G., Yang, M., Wu, H., Zhang, J., Song, S., Ma, E. and Guo, Y. (2011). Chronic accumulation of cadmium and its effects on antioxidant enzymes and malondialdehyde in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(5), 1355–62.



### CHAPITRE III

#### CHRONIC EXPOSURES TO IMIDACLOPRID OR THIAMETHOXAM ALTER REDOX STATE AND CAROTENOID-RETINOID LEVELS IN CAGED HONEYBEE (APIS MELLIFERA)

Maxime Gauthier<sup>1</sup>, Philippe Aras<sup>1</sup>, Joanne Paquin<sup>2</sup> et Monique Boily<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8*

<sup>2</sup> *Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-Ville, Québec, Canada H3C 3P8*

Contribution personnelle : Expérimentation (développement de méthode de dosage des rétinoïdes au HPLC-UV, dilution et contamination des sirops, dosage des rétinoïdes/caroténoïdes/vitamine E et de l'activité de l'AChE, calculs des volumes de sirops consommés), rédaction des sections (Résumé, Introduction, Matériel et méthode, Résultats et discussion, Conclusion). Traitement statistique des données, conceptions des tableaux et figures.

## 3.1 Abstract

In the last decade, the yearly dwindling populations of honeybees has grown in concern. Neonicotinoid (NEOCs) exposure is regularly mentioned to be linked to this phenomenon, but chronic exposure at environmentally relevant concentrations are needed to further recognize their implication in pollinator's health over longer periods of time. To better document these effects, honeybees were exposed for 10 days to environmentally relevant concentrations of technical grade imidacloprid (IMI) and thiamethoxam (THM) ranging from 0 to 400 ng/100 ml. After exposure, lipid peroxidation activity was investigated with the analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) followed with high performance liquid chromatography coupled with ultra violet detection to quantify many carotenoids (diatoxanthin, lutein, zeaxanthin,  $\alpha/\beta$ -cryptoxanthin and  $\alpha/\beta$ -carotene), retinoids (9/13-*cis* and all-*trans* retinoic acid - RA, retinol - ROL and retinaldehyde - RALD) and  $\alpha$ -tocopherol. Acetylcholinesterase levels were also measured, but showed no significant differences among concentrations tested. Honeybees exposed to IMI showed significant dose dependent decreases in  $\alpha$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol levels. THM induced decreases in 13-*cis* RA and ROL levels and also elicited an increase in lipid peroxidation. This study reports a wide variety of retinoids in the honeybee and reveal the effects of a longer term exposure on NEOCs-induced oxidative stress and its possible link with the carotenoid/retinoid metabolism. Modulation of this metabolism by xenobiotics should be further investigated as it might be implicated in various aspects of pollinator's health notably through development. Results presented in this study will improve risk assessment analysis and drive the development of biomonitoring tools relatively to pollinator's health.

(246 words)

Key words: Neonicotinoids, insecticides,  $\alpha$ -tocopherol, TBARS, HPLC-UV, lipid peroxidation, acetylcholinesterase

### 3.2 Introduction

Global honey bee decline has become a prior economic and environmental concern. While there is a consensus that this situation is the result of several factors, abnormal bee deaths have been associated with the widespread use of neonicotinoids (NEOCs). In fact, several countries restricted their use in order to protect pollinators, but their long term toxicity should be better documented to fully comprehend their implications in the non target organisms.

NEOCs were commercialised in the 1990s as systemic and broad-spectrum insecticides intended for agricultural pest management. Given their selective toxicity for insects and their wide array of applications (seed coating, foliar spray, soil drenches, etc.), they became the most widely used class of insecticides and now account for more than 23.7% of the world market (Jeschke *et al.*, 2011). In the last decade, the proportion of land cultivated with NEOCs coated seed especially imidacloprid (IMI), thiametoxam (THM) and clothianidin (CLO) has greatly increased in North America. In 2012, the main Canadian oleaginous culture, canola, which is essentially grown in Manitoba and Saskatchewan, was nearly all treated with NEOCs coating (Main *et al.*, 2014). Besides, in eastern Canada (Quebec and Ontario), NEOC-treated corn and soy (99% and 30-50% respectively) are dominant cultures (Giroux, 2015).

NEOCs levels in agroecosystems may vary greatly depending on mode of application and climatic factors, but several studies report their presence in bee-relevant plant matrices (pollen and nectar). In fact, IMI was found in pollen (maize and sunflower) at means of 2.1-3.0 µg/kg (up to 18 µg/kg) and in nectar (sunflower) at 1.9 µg/kg (Nauen *et al.*, 2001; Bonmatin *et al.*, 2005). THM and CLO were also found in maize pollen at means of 1.7 µg/kg and 3.9 µg/kg (Krupke *et al.*, 2012). Therefore, NEOCS are available for many pollinators. Routes of exposure to NEOCs and intoxication rates



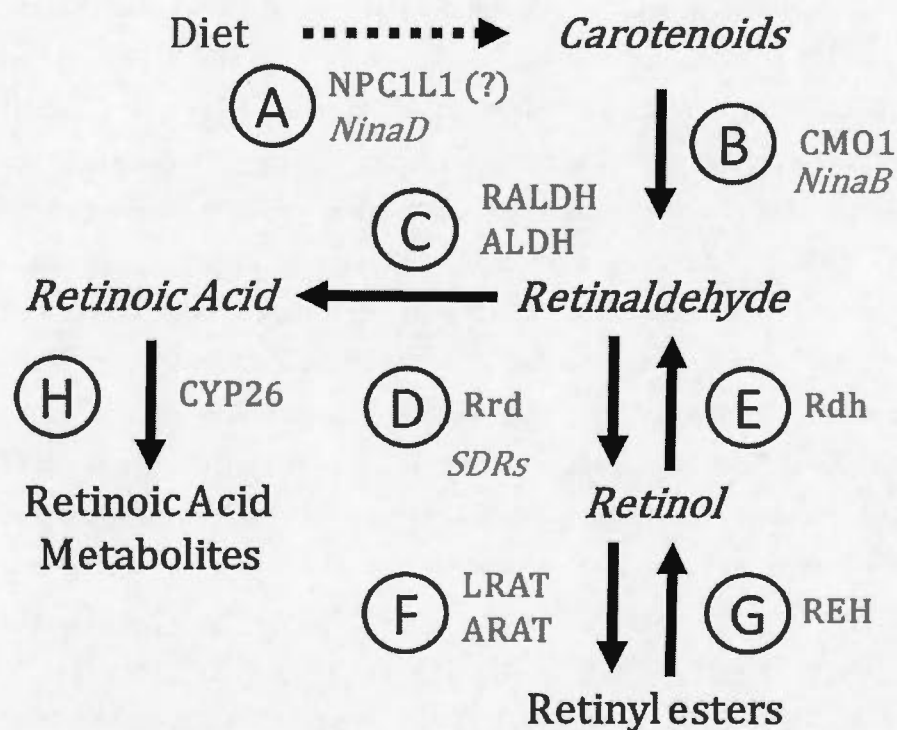
were investigated and confirmed for honeybees. Residues of IMI (1.2  $\mu\text{g/kg}$ ) were found in honeybee tissues and honey (0.7  $\mu\text{g/kg}$ ) (Chauzat *et al.*, 2011) as well as in beeswax (8  $\mu\text{g/kg}$ ) (Mullin *et al.*, 2010) confirming the exposure of bees to NEOCs through their foraging activities (see Blacqui re *et al.* 2012 for review). Moreover, foragers may also get in contact with particles of these chemicals via dust or guttation droplets emitted during sowing or application (Girolami *et al.*, 2009 ; Krupke *et al.*, 2012).

NEOCs were designed to act as insect acetylcholine agonists by binding to the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor (nAChRs) in the central nervous system and then, to cause paralysis and ultimately death of the crop pests. However, when honeybees were fed with technical or commercial formulations of NEOCs, side effects were reported on memory (Han, 2010), foraging activity (Schneider *et al.*, 2012), development (Gregorc and Ellis, 2011 ; Wu *et al.*, 2011) and immunity (James and Xu, 2012). Moreover, redox state proved to be perturbed by THM (Badiou-Bénéteau *et al.*, 2012). Oxidative stress occurs when the antioxidant defenses of an organism are unable to counterbalance the oxidant insults (reactive oxygen species) and may consequently alter several cell constituents (lipids, DNA and proteins) leading to tissue and organ function disorders. To maintain a redox homeostasis, *A. mellifera* relies on a battery of enzymatic and diet derived non-enzymatic antioxidants such as tocopherols (vitamin E) and carotenoids (Felton and Summers, 1995) present in pollen (Schulte *et al.*, 2009).

Carotenoids do more than protect the honeybees against oxidative damage, as some are precursors of retinoid compounds: retinol (ROL), retinaldehyde (RALD) and retinoic acid (RA) (Fig. 3.1). In vertebrates, the functions of carotenoids and retinoids are extensively studied because of the implication of RA in various crucial processes during embryonic development (cell growth and differentiation, axial/regional patterning, organogenesis, limb development, neurogenesis) and throughout adulthood (organ/tissue homeostasis and regeneration, vision, etc.). To regulate these processes



and to modulate RA levels, tight enzymatic activity is needed. Strict control of RA transcription pathways also involves isomerisation between '*trans*' and '*cis*' forms and



**Figure 3.1** Retinoid metabolism as known in vertebrates (bold text) and insects (italic). A) **Niemann–Pick C1-like 1** (Reboul, 2013) / *Neither inactivation nor afterpotential D* (*NinaD*) B) **Carotenoid mono-oxygenase 1** (CMO1) / *Neither inactivation nor afterpotential B* (*NinaB*) C) **Retinal Dehydrogenase (RALDH)** or **Aldehyde dehydrogenase (ALDH)** D) **Retinal reductase (Rrd)** / *Short chain dehydrogenases/reductases (SDRs)* E) **Retinol dehydrogenase (Rdh)** F) **Lecithin retinol acyltransferase (LRAT)** or **Acyl CoA:retinol acyltransferase (ARAT)** G) **Retinyl ester hydrolase (REH)** H) **Cytochrome P450 26 (CYP26)**

differential binding affinity to nuclear receptors (RXR, RAR and the Peroxisome proliferator-activated receptor - PPAR). In insects, retinoids have been mostly studied relatively to their role as chromophores in vision. However, recent literature suggests that retinoids, namely retinoic acid, would play similar roles in insects to those found in vertebrate's development (see Albalat, 2009 for review). In fact, studies showed that RA may cause developmental malformations in the tick (*Rhodnius prolixus*) (Nakamura *et al.*, 2007) and *Drosophila melanogaster* (Halme *et al.*, 2010) and influence metamorphosis and organogenesis in the firebug (*Pyrrhocoris apterus*), the red cotton stainer (*Decipifus cingulatus*) and the mealworm (*Tenebrio molitor*) (Němec *et al.*, 1993). While retinoid metabolism has been shown to be sensitive to agrochemicals in fish, frog, bird and mammal (see Campbell *et al.*, 2004 for review), the mechanisms underlying the retinoid functions in insects remain poorly understood. In the study by Hedrei-Helmer *et al.*, (2015) the authors have roughly investigated the retinoid metabolism in honeybees exposed to atrazine, glyphosate and metolachlor. The tight regulation of retinoid metabolism as known in vertebrates and the sensitivity of this system to agricultural contaminants could be further exploited for the development of biomonitoring tools. So far, several toxicological studies involving bees exposed to sub-lethal doses of NEOCs were conducted for short periods of time. However, side effects of a longer-term exposure to environmentally realistic concentrations of NEOCs are not known. Taking into account the health status of pollinators, the lack of knowledge regarding the biological functions of carotenoid/retinoid metabolism in insects and the reported deranged processes in honeybee exposed to NEOCs (memory, learning, immunity and development), the goal of this study was to further document biochemical alterations derived from a chronic exposure of honey bees to environmentally realistic concentrations of NEOCs. Knowing that retinoid metabolism is maintained by redox processes and that NEOCs may induce oxidative stress, both retinoids and lipid peroxidation were investigated. In parallel, the non-enzymatic antioxidants  $\alpha$ -tocopherol and carotenoids were quantified

by HPLC-UV and a method was adapted to better quantify polar retinoids. This paper sheds light on the possible NEOCs- mediated biochemical alterations of the carotenoid/retinoid metabolism via redox processes and promotes development of retinoid-based biomarkers in order to assess the pollinator's health.

### 3.3 Materials and methods

#### 3.3.1 Chemicals

Standards for carotenoids (lutein, zeaxanthin,  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene) were purchased from DHI Labs (Hørsholm, Denmark). Acetylthiocholine iodide, butylated hydroxytoluene (BHT), cholesterol ( $\geq 99\%$ ), 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoic acid (DTNB), malondialdehyde (MDA), retinoids (13-*cis*-RA, 9-*cis*-RA, all-*trans*-RA, all-*trans*-ROL and RALD), sodium phosphate monobasic, t-octylphenoxypolyethoxyethanol (triton X-100), tris[hydroxymethyl]-aminomethane (Trizma base), vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), antipain dihydrochloride, pepstatin A, 2-thiobarbituric acid (TBA) and technical grade imidacloprid and thiametoxam were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Oakville, ON, Canada). Ascorbic acid, pyridine, BSA (bovine albumin serum), Pierce BCA protein assay kits, sodium deoxycholate, trichloroacetic acid and sodium dodecyl sulfate were from Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada). HPLC-grade solvents were used.

#### 3.3.2 Honey bee exposure

Cage exposure was based on a protocol from Gauthier *et al.* (2015) with few modifications. Bees were selected from frames without brood (same bee hive) during summer 2014 for exposure to THM (17<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup> of July) and IMI (30<sup>th</sup> to 9<sup>th</sup> of August). Four cages per concentration were tested (30 bees per cage) for a total of 120 bees per



concentration. Technical insecticides were used, dissolved in sucrose solution (50% w/w) and kept at -20° C until use. Required volumes of contaminated syrup were thawed daily and aliquoted in feeders (1.5 ml centrifugation tubes). Feeders were weighted before and after changes (to monitor syrup consumption) for the 10-day exposure. Technical grade insecticides were used in this study. Our exposure levels were inspired from previous work of Hedrei-Helmer *et al.*, (2015). Only here, the 5% of the LD<sub>50</sub> threshold (3 – 41 ng/bee for IMI and approximately 4 ng/bee for THM) was used to approximate an intermediate dose from which was computed lower and higher syrup concentrations by increments of 3.2 factors. Concentrations of IMI and THM stock solutions were verified by chemical analysis by the Laboratoire d'expertises et d'analyses alimentaires (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec). They were respectively 6 and 8% over our expectation and for convenience, concentrations were rounded and are referred in the paper as 0; 6; 20; 60 and 200 ng/100 ml for IMI-contaminated syrups and 0; 12; 40; 120 and 400 ng/100ml for THM-contaminated syrups. Following analyses, daily pesticide intake (pg/bee) were estimated by multiplying the experimental syrup concentration (pg/μl) per their daily syrup intake (μl/bee) and presented in table 3.1. Control cages were supplied with sucrose solution only. After exposure, bees were euthanized by placing cages in an insulated container with dry ice for 5 min and were conserved at -80° C. Bees from each concentration were randomly mixed before AChE measurements, retinoids, carotenoids, α-tocopherol and lipid peroxidation analysis.

### 3.3.3 AChE measurements

*Enzyme solubilisation* - Method was adapted from Boily *et al.* (2013) using four bee heads instead of eight to ten. Bees were weighed before severing the heads from the body in weighing dishes disposed on dry ice. Heads were homogenized in 1.0 ml of Low salt triton (LST) buffer (10 mM NaCl, 1 % w/v Triton X-100, 15 mM sodium phosphate), pH7.3 with a polytron and spinned for 30 s to remove bubbles. The



homogenate was centrifuged at 100,000×g for 1h at 4°C (rotor SW50.1, Beckman Counter Optima L-100 XP). The supernatant was discarded and the pellet was rinsed with 200 µl LST buffer, which was recovered and combined with the supernatant. The pellets were re-suspended with 500 µl of LST buffer and processed as above. The combined supernatants and rinsing volumes (±1700 µl) were used for AChE assay and protein analysis. Reactive media were made according to Boily et al. (2013).

*Enzymatic assay* - Assay was carried out following the same method from Boily et al. (2013) using 30 µl supernatant previously generated. Analyses (n = 9-10) were performed for each concentration of pesticides tested and their respective control group. Values of blank reaction tubes were subtracted to provide AChE activity. Values of AChE activity were expressed as mOD/h/g protein and referred in the text as AChE activity where values of absorbance (OD) at 412nm after 10 minutes were subtracted from values recorded at 35 minutes and converted to mOD. Reading was performed on a spectrophotometer (Infinite M1000 Quadruple Monochromator Microplate Reader, Tecan Group Ltd., Durham, NC, USA).

#### 3.3.4 Tissue preparation for (pro)-vitamins and TBARs assays

Tissue preparation followed the steps described in Gauthier et al. (2015) with few modifications. Briefly, ten whole bees were weighed, rinsed with 100% acetone and homogenized on ice in a glass tube (12-ml screw top borosilicate) with 4 ml of daily fresh homogenization solution pH 7.5 (PBS containing 0.05 mM antipain, 5 µM pepstatin A and 0.5% ascorbic acid). The resulting homogenate was used for all subsequent analyses. A volume of 2 ml of the homogenate was transferred into a second 12-ml glass tube and kept on ice for retinoids, carotenoids, and α-tocopherol analysis. The remaining homogenate was centrifuged at 4°C, 9600 × g for 10 min and the supernatant was aliquoted and frozen at -80°C for subsequent lipid peroxidation and

triglyceride quantification. Eight pools of 10 bees were prepared for each concentration of insecticide tested.

### 3.3.5 Carotenoids, retinoids and $\alpha$ -tocopherol analysis

Tissue homogenate (2ml) (see previous section) was mixed with 1 ml of MeOH (0.1% BHT), vortexed for 30 sec, and extracted three times with hexane (0.1% BHT): acetone (50:50) using 4 ml for the first extraction, and 3 ml for the second and third extractions. After each addition of the hexane: acetone solution, the tube was vortexed for 90 s and centrifuged for 5 min at  $1625 \times g$ . In order to reduce the evaporation time, the supernatant (1.5 ml) was collected and distributed evenly between two 5-ml disposable glass tubes and evaporated to dryness for 10 min in a vacufuge (Eppendorf<sup>TM</sup>, Fisher Scientific, Ottawa, Canada) at 45°C. This procedure was repeated with the second extraction (1.7 ml) and the third extraction (1.5 ml). The residue in each tube was resuspended in 100  $\mu$ l acetonitrile and vortexed for 30 sec. From each tube, 80  $\mu$ l were collected and combined in a 5-ml disposable glass tube, vortexed for 10 sec and injected in HPLC. Two injections were performed simultaneously in two reversed-phase HPLC systems (Water Corporation, Milford, MA) connected to Empower Pro software, version 5.0, a model 510 pump and a model 7725i Rheodyne injector.

HPLC 1 – Carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol. The detection of carotenoids was performed as described in Hedrei-Helmer *et al.*, (2015) with the addition of  $\alpha$ -tocopherol detected at 292nm using the same chromatographic method.

HPLC 2 – Retinoids. This system was equipped with a model 486 detector set at 325 nm. The retinoids from a 80- $\mu$ l injection were separated on an Ace C18 analytical column,  $4.6 \times 150$  mm, 3  $\mu$ m (Canadian Life Science, Peterborough, ON, Canada), using gradient elution with the initial solvent A: ACN-H<sub>2</sub>O-formic acid (60:40:0.1) changing linearly over a 5-min period to the final solvent B: ACN-H<sub>2</sub>O-formic acid (85:15:0.1). After 15 min on solvent B, a 3-min linear gradient was used to return to

100% solvent A. These conditions were held for 3 min for equilibration of the column. The flow rate was 1.0 ml/min for the total 26-min elution time. Under these conditions, the retention times for 13-*cis*-RA, 9-*cis*-RA, all-*trans*-RA and all-*trans*-ROL (Fig. 3.2) were 11.9; 12.5; 13.9 and 14.2 min. RALD isomers (*trans* and *cis*) co-eluted and formed a double peak (retention time: 15.9 and 16.1). The two peaks (area under curve) were then summed and are referred to in the text as retinaldehyde. All peaks were identified with commercial standards. Honey bee tissue extraction and chromatography were performed under yellow incandescent light to prevent isomerization of the compounds.

### 3.3.6 Lipid peroxidation quantification

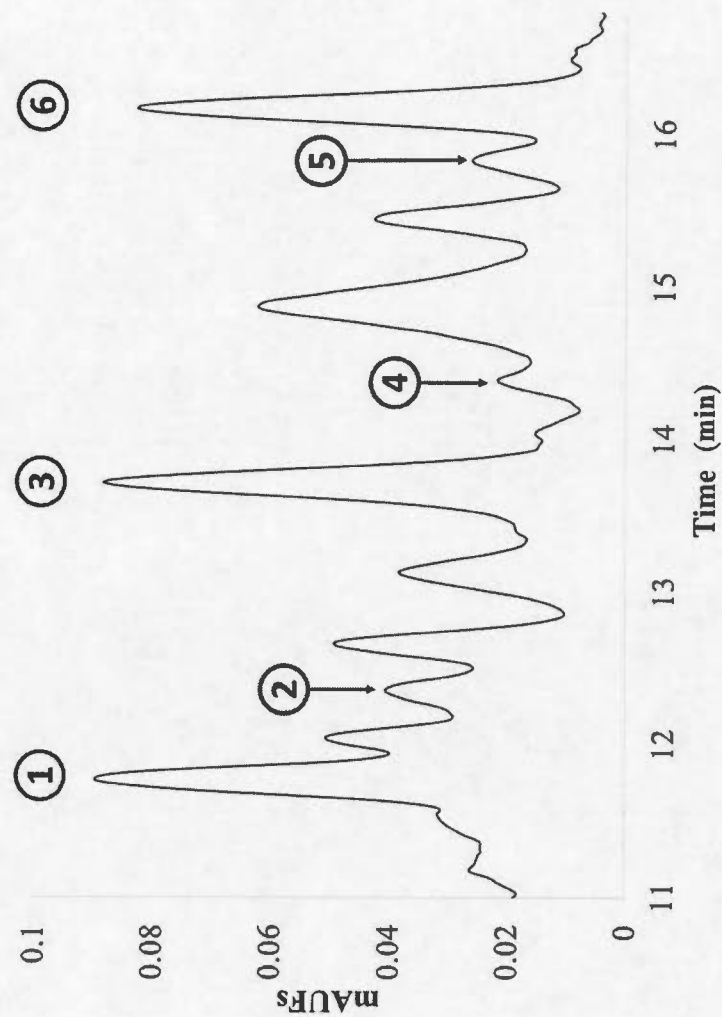
The measurement of oxidative stress was evaluated with the thiobarbituric acid (TBA) reactive substances (TBARS) method as presented in Hedrei-Helmer *et al.*, (2015) from 200  $\mu$ l of previously generated homogenates (see section 3.3.4). This method relies on quantification of malondialdehyde (MDA) a product of lipid peroxidation that reacts with TBA. TBARS values are reported as ng of TBARS per  $\mu$ g of triglycerides as suggested by Jentzsch *et al.* (1996). Triglycerides were measured with EnzyChrom™ Triglyceride Assay Kit from BioAssay Systems (Cat# ETGA-200) using 40  $\mu$ l of the same homogenate.

### 3.3.7 Statistical analysis

Survival curves along the 10-day exposure were tested with Log rank (Mantel-Cox) tests using Prism® 6.05 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA) comparing curves from each concentration to their control. Mean daily syrup consumption per per bee, whole body mass, retinoids (9-*cis*-RA, 13-*cis*- RA, *at*-RA, *at*-ROL and retinaldehyde), carotenoids (lutein, zeaxanthin,  $\alpha$ -/ $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -/ $\beta$ -carotene),  $\alpha$ -tocopherol, triglycerides, lipid peroxydation and AChE activity mean values were







**Figure 3.2** HPLC chromatogram of whole honey bee extract. Peaks are (1) 13-*cis* RA (2) 9-*cis* RA (3) all-*trans* RA (4) ROL and (5-6) *cis/trans* RALD. Peaks were identified with commercial standards.



compared using a general linear model (GLM) one-way analysis of variance comparing each concentration with its relative control. Significant ( $p < 0.05$ ) models were followed by Dunnett  $t$  test against the control group. The normality of data distribution and the homogeneity of variance were addressed with Shapiro-Wilk and Levene test respectively, and outliers were identified and discarded following Grubb's test. In case of unequal variance, a Welch's ANOVA was performed. Student  $t$  tests were made to compare control honeybees from both exposures. When transformations failed to normalize the distribution of data, non-parametric Kruskal-Wallis (KW) tests were used, followed by Dunn's multiple comparison test. Non-parametric Jonckheere-Terpstra (JT) test, based on the medians ordered in a particular direction, was performed (with outliers) to detect if a concentration dependent relationship was present. All carotenoids, retinoids and  $\alpha$ -tocopherol levels were also tested between control groups of both exposure with student T test when normality was confirmed, otherwise Wilcoxon non-parametric test was used. Finally, relationships between variables (and concentrations) were examined by Spearman correlations. Statistics were performed with SPSS® Statistic 18.0 software (IBM ® Corporation, NY, USA).

### 3.4 Results and discussion

The exposure of honey bees to THM or IMI did not cause a dose-relationship mortality. In fact, the mean survival for all groups of bees was between 95 and 100% (Table 3.1). When testing all different curves individually with their respective control, significant difference was found only with 120 ng/100 ml of THM ( $\chi^2 = 4.558$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.05$ , log-rank test). Mortality guidelines for chronic oral toxicity assessment on honeybees are yet to be published. According to the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 1998), mortality for acute tests should not be more than 10%. Thus, the mortality of less than 5% obtained with our chronic exposures appears quite acceptable and above all, the low mortality reflects our objective to measure physiological components with bees exposed to nonlethal doses. In parallel, mean daily





**Table 3.1** Means ( $\pm$  SD) of body mass, survival and daily consumption of contaminated syrup for honeybees exposed to increasing doses of insecticides for 10 days

Insecticides (ng/100ml syrup)	Body mass (g)	Survival (%)	Daily syrup intake ( $\mu$ l/bee)	Estimated daily insecticide intake (pg/bee) <sup>1</sup>
<i>Imidacloprid</i>				
Control	1.46 $\pm$ 0.06	94.8 $\pm$ 7.0	39.2 $\pm$ 7.0	0.0
6	1.43 $\pm$ 0.07	96.4 $\pm$ 5.4	33.8 $\pm$ 3.4	2.1
20	1.44 $\pm$ 0.05	98.6 $\pm$ 2.8	39.2 $\pm$ 1.1	7.9
60	1.51 $\pm$ 0.05	94.9 $\pm$ 4.8	39.1 $\pm$ 1.2	25.2
200	1.45 $\pm$ 0.06	97.9 $\pm$ 2.7	39.2 $\pm$ 5.5	81.0
<i>Thiamethoxam</i>				
Control	1.43 $\pm$ 0.07	99.3 $\pm$ 1.4	32.4 $\pm$ 3.3	0.0
12	1.45 $\pm$ 0.04	98.6 $\pm$ 2.9	32.6 $\pm$ 4.3	4.1
40	1.40 $\pm$ 0.09	97.2 $\pm$ 2.2	32.7 $\pm$ 6.7	12.9
120	1.41 $\pm$ 0.06	95.1 $\pm$ 2.7*	32.0 $\pm$ 4.3	42.0
400	1.40 $\pm$ 0.06	100 $\pm$ 0.0	29.5 $\pm$ 3.1	124.3

\*  $p < 0.05$  log-rank (Mantel-Cox) test

<sup>1</sup> Syrup insecticide concentration (pg/ $\mu$ l) \* daily syrup intake ( $\mu$ l/bee) (see Materials and methods)



syrup intake per bee x concentration (Table 3.1), did not differ from their relative control groups which ensured increasing levels of intoxication and confirmed the non-repellent character of the syrups.

Although NEOCs are known nAChRs agonists, some scarce studies are reporting AChE disorders following exposure to neonicotinoids (mostly IMI) (Morakchi *et al.*, 2005; Abou-Donia *et al.*, 2008 ; Dondero *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2010; Kimura-Kuroda *et al.*, 2012; Boily *et al.*, 2013). That being said, we would have expected a augmentation or a decrease following IMI and THM exposures. However, mean AChE activity (Table 3.2) was not significantly altered in neither exposures (up to 200 ng/100 ml of IMI or 400 ng/100 ml of THM) suggesting that amounts of ingested technical formulations insecticides were below the levels susceptible of producing biological effects on AChE activity.

In our study, bees exposed to IMI exhibited a significant difference in  $\alpha$ -carotene contents ( $F_{4,33} = 4.62$ ,  $p < 0.05$ ) being lower at 60 ng/100 ml than the control group (Table 3.2). Also, when Jonkheere-Terpstra test was conducted to evaluate a potential dose dependency, it was revealed that the  $\alpha$ -carotene levels decreased consequently with the augmentation of IMI exposure (JT = 196;  $p < 0.05$ ;  $n = 38$ ). A significant JT test was also observed for decreased  $\alpha$ -cryptoxanthin levels (JT = 214;  $p = 0.057$ ;  $n = 38$ ). On the other hand, THM exposure only affected zeaxanthin contents where a tendency to decrease has been observed ( $F_{4,35} = 1.69$ ,  $p < 0.1$ ). The levels of zeaxanthin, reported as a carotenoid storage form for honeybee larvae, showed tendency to be lower in bees exposed to 40 ng/100 ml of THM. It is interesting to note that the diminution of carotene was reported only for the  $\alpha$ - form, which is also known to be more prone to oxygen singlet quenching (Di Mascio *et al.*, 1991). Honeybee is not the only animal that seems to present an altered carotenoid metabolism after IMI exposures. Under a diet composed of seeds coated with a commercial formulation of IMI (Escocets®), red-

**Table 3.2** Means  $\pm$  SD of carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol and triglycerides contents (ng/g tissue) in whole honeybee and head protein concentration (mg/g tissue) and AChE (mOD/g prot/h) activity in bees exposed to increasing doses of insecticides for 10 days

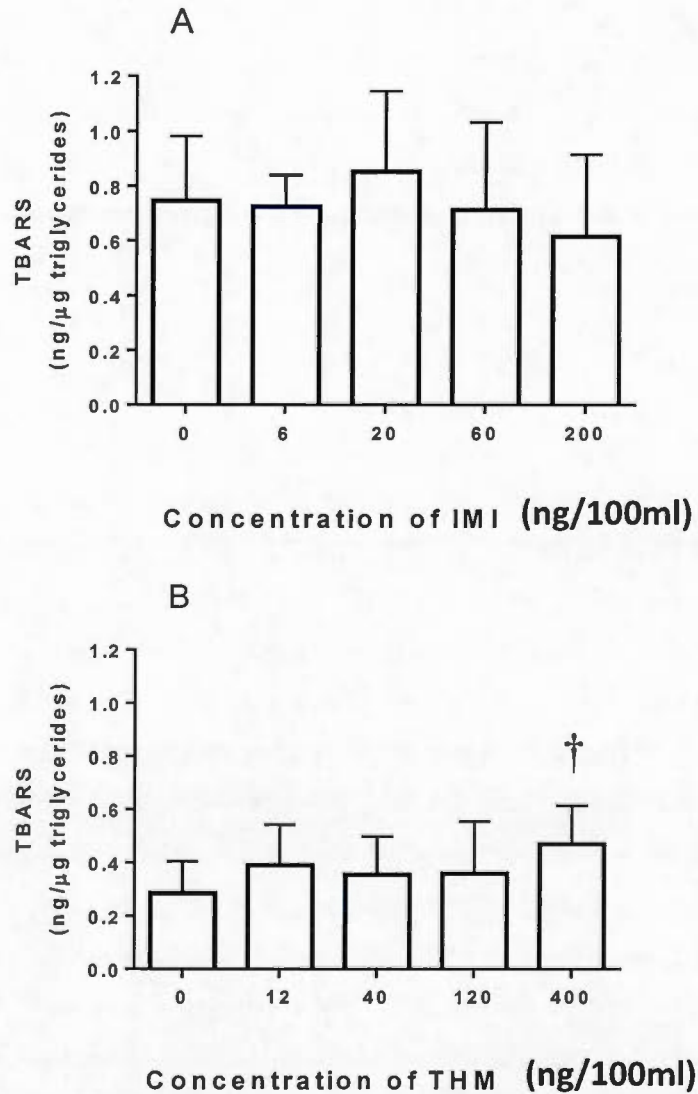
Insecticides (ng/100ml syrup)	Diatoxantin	Lutein	Zeaxantin	$\alpha$ - Cryptoxantin	$\beta$ - Cryptoxantin	$\alpha$ - Carotene	$\beta$ - Carotene	$\alpha$ - Tocopherol	Triglycerides	Proteins	AChE
<i>Imidacloprid</i>											
Control	25.4 $\pm$ 1.4	159 $\pm$ 9	141 $\pm$ 6	83.6 $\pm$ 5.9	66.2 $\pm$ 3.7	254 $\pm$ 5	116 $\pm$ 2	175 $\pm$ 7	495 $\pm$ 112	32.2 $\pm$ 6.5	0.51 $\pm$ 0.21
6	29.7 $\pm$ 2.0	158 $\pm$ 4	140 $\pm$ 6	80.8 $\pm$ 3.0	68.5 $\pm$ 2.4	263 $\pm$ 8	124 $\pm$ 1	166 $\pm$ 7	502 $\pm$ 92	36.2 $\pm$ 6.8	0.43 $\pm$ 0.14
20	25.3 $\pm$ 1.4	157 $\pm$ 8	136 $\pm$ 6	79.2 $\pm$ 5.6	68.5 $\pm$ 2.8	251 $\pm$ 1	121 $\pm$ 2	164 $\pm$ 1	441 $\pm$ 60	30.5 $\pm$ 8.5	0.51 $\pm$ 0.21
60	23.5 $\pm$ 4.2	138 $\pm$ 5	123 $\pm$ 6	71.4 $\pm$ 4.5	60.1 $\pm$ 2.8	212 $\pm$ 8*	78 $\pm$ 1	148 $\pm$ 9†	486 $\pm$ 101	34.9 $\pm$ 11.8	0.51 $\pm$ 0.21
200	26.8 $\pm$ 2.5	155 $\pm$ 8	141 $\pm$ 7	73.5 $\pm$ 3.1	67.8 $\pm$ 3.1	233 $\pm$ 8	119 $\pm$ 2	158 $\pm$ 1	509 $\pm$ 107	33.2 $\pm$ 8.2	0.43 $\pm$ 0.13
<i>Thiametoxam</i>											
Control	11.5 $\pm$ 0.6	206 $\pm$ 15	94 $\pm$ 8	77.5 $\pm$ 7.0	41.3 $\pm$ 2.5	162 $\pm$ 2	199 $\pm$ 3	123 $\pm$ 1	714 $\pm$ 78	37.8 $\pm$ 8.5	0.47 $\pm$ 0.17
12	10.9 $\pm$ 0.6	175 $\pm$ 20	88 $\pm$ 6	63.9 $\pm$ 4.1	38.8 $\pm$ 2.4	167 $\pm$ 2	132 $\pm$ 2	134 $\pm$ 7	682 $\pm$ 85	39.9 $\pm$ 9.9	0.39 $\pm$ 0.13
40	15.9 $\pm$ 1.5	168 $\pm$ 15	73 $\pm$ 7†	73.6 $\pm$ 4.4	38.2 $\pm$ 1.7	140 $\pm$ 1	203 $\pm$ 2	132 $\pm$ 2	692 $\pm$ 86	38.7 $\pm$ 7.4	0.38 $\pm$ 0.19
120	14.0 $\pm$ 2.3	195 $\pm$ 15	88 $\pm$ 6	72.2 $\pm$ 6.1	41.4 $\pm$ 2.4	169 $\pm$ 1	241 $\pm$ 3	153 $\pm$ 1	673 $\pm$ 127	36.2 $\pm$ 6.5	0.44 $\pm$ 0.16
400	10.4 $\pm$ 1.1	174 $\pm$ 12	78 $\pm$ 5	77.6 $\pm$ 5.0	41.1 $\pm$ 1.3	180 $\pm$ 1	161 $\pm$ 1	137 $\pm$ 7	661 $\pm$ 115	34.9 $\pm$ 11.9	0.42 $\pm$ 0.18

\*  $p < 0.05$  †  $p < 0.1$  GLM one-way analysis of variance followed by Dunnett  $t$  test



legged partridges (*Alectoris rufa*) showed a modified beak tint and reduced eye-ring pigmentation which are both carotenoid-based colorations (Lopez-Antia *et al.*, 2015). These effects were noted at one fifth and twice the recommended usage of Escocets® by the Spanish regulations. An explanation could be an upstream decreased absorption of carotenoids in the midgut. In *D. melanogaster*, a class B scavenger receptor (NinaD) expressed in the midgut was identified as essential for carotenoid uptake (Kiefer *et al.*, 2002). If such receptor is present in the honeybee, one avenue to explain the molecular basis of the diminution of  $\alpha$ -carotene could be via an alteration of its functions. However, Lopez-Antia *et al.* (2015) suspected an increase of IMI-induced oxidative metabolism of zeaxanthin.

Response to oxidative stress following IMI exposure has been documented several times across phyla, notably in plants (Ford *et al.*, 2011), invertebrates (Malev *et al.*, 2012), fishes (Ge *et al.*, 2015), and rats (Kapoor *et al.*, 2010; Bal *et al.*, 2012; Mohany *et al.*, 2012). Therefore, similar response was expected in honeybees. However, contrarily to our expectations, no lipid peroxidation was recorded after IMI exposures at up to 200 ng/100 ml (Fig. 3.3). However, the absence of detected lipid peroxidation does not vouch for an unaffected redox state. For example, in the studies of Lopez-Antia *et al.* (2015), these authors observed a higher SOD activity in the red blood cells of *A. rufa*, but did not observe lipid peroxidation nor reduction of glutathione redox system. That being said, this activity could have been prevented by antioxidant processes such as enzymatic activity that occurs prior to lipid peroxidation (not measured in our study). On the other hand, we noted that  $\alpha$ -tocopherol levels (Table 3.2) followed a tendency to diminish at 60 ng/100 ml of IMI ( $F_{4, 32} = 1.93$ ,  $p = 0.067$ ). Further test showed that this diminution was also significantly dose dependant (JT = 204;  $p < 0.05$ ;  $n = 38$ ). Considering the antioxidant properties of vitamin E and its clear role in protection against oxidative damage in biological membranes, this fat soluble vitamin could have counteracted lipid peroxidative damages resulting in its



**Figure 3.3** Means  $\pm$  SD of TBARs (ng/ $\mu$ g triglycerides) contents in honeybees exposed to increasing doses of imidacloprid (A) and thiametoxam (B). One-way analysis of variance followed by Dunnett  $t$  test †  $p < 0.1$

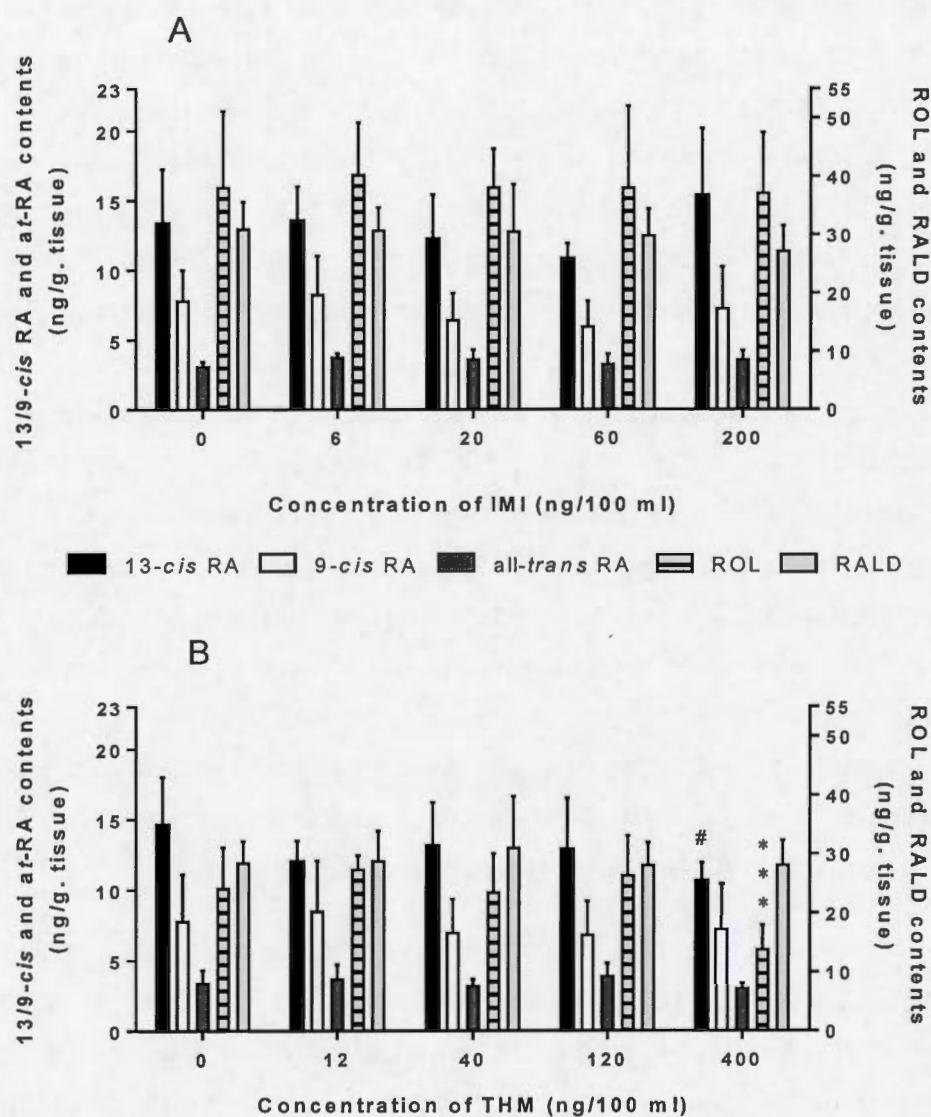
degradation. In parallel, IMI has been shown to induce overexpression of many CYP 450 which are oxidation catalysts of many cellular constituents such as lipids and vitamin E (Derecka *et al.*, 2013). Consequently, it is not excluded that the dose dependant diminution in vitamin E levels could be partially or entirely caused by a higher degradation by CYP 450 enzymes, but it is considered less plausible as triglyceride levels did not seem to be altered by IMI exposures (Table 3.2). According to our results, we cannot reject a possible IMI-induced oxidative stress in exposed bees, but would consider the use of a wider array of oxidative stress markers in future studies. Affected redox functions could alter the retinoid metabolism. In vertebrates, it is known that a complex enzymatic cascade regulates the formation of RA, however few studies investigated the presence of retinoid species or related enzymes in insects. Following the identification of several retinoid species and isomers in invertebrates, a few also reported in insects, it was recently postulated that many metabolic similarities may exist across evolution. In the past, retinoid levels were shown to be modulated by agrochemicals in amphibians, fishes, birds and mammals and it seems that honeybee's retinoids system is not an exception. So far, NinaB; an isomeroxygenase that combines the carotene oxygenase and retinoid isomerase functions was found in few insects, notably *D. melanogaster*, *Anopheles Gambiae* and *Apis mellifera*. In *D. melanogaster*, 5 short chain dehydrogenases (SDRs) were shown to be biochemically similar to the human Rdh12 and were suggested to convert all-*trans* RALD or all-*trans*-3-hydroxy RALD to ROL isomers and might also be implicated in the reverse reaction in some cell types (Belyaeva *et al.*, 2009). Also, human Aldh1a ortholog genes found in some insects (*A. mellifera*, *Anopheles gambiae* and *Tribolium castaneum*) suggest potential candidates for the oxidation of RALD to RA (Albalat and Cañestro, 2009). In the great wax moth (*Galleria mellonella*), NinaB was characterised and was shown to use many carotenoids notably  $\alpha/\beta$ -carotene, cryptoxanthin, lutein and zeaxanthin in order to produce various proportions of RALD isomers (Oberhauser *et al.*, 2008; Babino *et al.*,



2016). Knowing that, it seems coherent to report that RALD levels in honeybees exposed to IMI showed a tendency to decrease dose dependently (JT = 209;  $p < 0.1$ ,  $n = 37$ ). While such diminutions were reported for RALD, similar results were not observed for other retinoids in IMI-exposed bees. Although it is only a tendency, it is worth mentioning as it may be the first manifestation of a metabolic alteration. Here, one could postulate that the diminution in precursors; here  $\alpha$ -carotene and  $\alpha$ -cryptoxanthin also reported in this study is limiting the substrate for RALD synthesis. *In vitro* studies on rat intestinal postmitochondrial fraction, reported that the antioxidant property of vitamin E would prevent random excentric cleavage of  $\beta$ -carotene into  $\beta$ -apo-carotenoids promoting RALD formation (Yeum *et al.*, 2000). Interestingly, we observed a significant positive relationship between the vitamin E and the RALD levels, but only when honeybee were exposed to 20 ng/100 ml of IMI ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ). The diminution of vitamin E could have led to the formation of  $\beta$ -apo-carotenoids (not quantified) and consequently to the diminution in RALD contents. At the highest concentration of IMI (200 ng/100 ml), a significant positive relationship was found between RALD and ROL levels ( $r = 0.74$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) suggesting an alteration of the enzymes responsible for this oxidation/reduction step (see D and E, Figure 3.1). As this relationship was not found for other groups, one could hypothesize that the observed concurrent levels of RALD and ROL could be the result of an imbalance in metabolism at the highest concentration of IMI.

Polar retinoid levels seemed more heavily altered by THM than by IMI exposures (Fig. 3.4). When compared to the control group, the highest concentration of THM (400 ng/100 ml) caused a clear reduction in ROL ( $F_{4, 34} = 14.07$ ,  $p < 0.0001$ ) and 13-*cis* RA ( $Z = 2.63$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 40$ ). This diminution was qualified as dose dependent across concentrations for these two compounds; ROL (JT = 230;  $p < 0.05$ ;  $n = 40$ ) and 13-*cis* RA (JT = 233;  $p < 0.05$ ;  $n = 40$ ). Finally, a negative correlation between 13-*cis* RA and all-*trans* RA levels ( $r = -0.70$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ) was observed for the highest concentration of THM (400 ng/100 ml). Levels of all-*trans* RA being more





**Figure 3.4** Means  $\pm$  SD of retinoid contents in honeybees exposed to increasing doses of imidacloprid (A) and thiametoxam (B). Kruskal–Wallis one-way analysis of variance followed by Dunn’s nonparametric tests #  $p < 0.05$ . One-way analysis of variance followed by Dunnett  $t$  test \*\*\*  $p < 0.001$

transcriptionally active than the 13-*cis* RA, it is relevant to highlight this observation as the isomerisation process between these two compounds could be lessened. In *A. mellifera*, Hedrei-Helmer *et al.*, (2015) demonstrated that both  $\beta$ -carotene and ROL levels were decreased after atrazine and glyphosate exposures, and noted an increase in ROL contents after metolachlor exposure, but other forms of retinoids were not quantified and no changes were observed for lipid peroxidation (TBARS). In the present study, we observed a tendency to increased TBARs (ng/g. triglycerides) ( $F_{4, 35} = 1.52, p = 0.0701$ ) at the highest concentration of THM (400 ng/100 ml). This increase was further demonstrated to be dose dependent concurrently with the THM exposure (JT = 401;  $p = 0.054$ ;  $n = 40$ ) (Fig. 3.3 and 3.4). Considering the numerous enzymatic oxidations processes in retinoid metabolism leading to RA, one can postulate on a global increase in oxidative stress leading to a decrease in ROL and 13-*cis* RA compounds. It is known that the 13-*cis* isoform of RA binds with less affinity to nuclear receptors than do 9-*cis* and all-*trans* RA and, consequently, is less transcriptionally active (Blaner, 2001). In fact, 9-*cis* RA binds with high affinity to both RXR and RAR. On the other hand, all-*trans* RA binds to RAR and PPAR, but does not seem to bind to RXR. In honeybee, RAR has not yet been found, but RXR was identified. Consequently, it is possible that an organism would tend to minimize the effects on the less transcriptionally active form (13-*cis* RA) rather than the more active forms of RA (all-*trans* and 9-*cis* RA) to prevent unwanted genomic activation.

Since apolar storage forms of retinol (ex: retinyl esters) have never been found in the honeybee (Albalat, 2009), no comparison with the alterations in their contents usually reported in vertebrates can be done. However, instead of alterations in retinyl esters storage forms, imbalances could be manifest in the ROL content itself. Practically, the effect of increased oxidation would be an augmented activity of Rdh and RALDHs alone or together with a reduced activity in Rrd. The contrasting unaffected levels of RALD suggest that NinaB, in this case palliated to the degradation of RALD to maintain a sufficient level of this retinoid considering its essential role as chromophore

in the honeybee's vision (Goldsmith, 2013). Such compensation could have led to diminutions of zeaxanthin levels, also reported in our study. A general increase in oxidative metabolism would also have caused increases in RA metabolites, but such compounds were not identified in the honeybee yet. However, a few unidentified peaks in our chromatograms could be polar metabolites of RA. Since mechanisms underlying retinoid metabolism in insect are elusive, we recommend further investigations aiming the identification and characterisation of implicated enzymes. It is important to mention that different levels of carotenoid, ROL, vitamin E, triglycerides and lipid peroxidation were reported between IMI and THM-control honeybees after 10 days. Following exposures, control honeybee for THM exposures had significantly higher levels of lutein ( $t = 2.71$ ;  $df = 11.63$ ;  $p < 0.05$ ),  $\beta$ -carotene ( $t = 2.77$ ;  $df = 11.56$ ;  $p < 0.05$ ) and triglycerides ( $t = 4.54$ ;  $df = 12.51$ ;  $p < 0.001$ ) when compared to control bees from IMI exposures. On the other hand, control bees for IMI exposure showed significantly higher levels of ROL ( $\chi^2 = 6.35$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.05$ ;  $n = 8$ ), diatoxantin ( $t = 8.77$ ;  $df = 8.30$ ;  $p < 0.0001$ ), zeaxanthin ( $t = 4.66$ ;  $df = 13.15$ ;  $p < 0.001$ ),  $\beta$ -cryptoxanthin ( $t = 5.63$ ;  $df = 12.34$ ;  $p < 0.0001$ ),  $\alpha$ -carotene ( $t = 4.97$ ;  $df = 7.91$ ;  $p < 0.05$ ),  $\alpha$ -tocopherol ( $t = 3.55$ ;  $df = 11.38$ ;  $p < 0.01$ ) and lipid peroxidation ( $\chi^2 = 11.29$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0.01$ ;  $n = 8$ ). Levels of retinoids and carotenoids detected in this study are similar to those we published earlier (Hedrei-Helmer *et al.*, 2015), except for  $\alpha$ -tocopherol levels that were above those reported in 2013. Variations in carotenoids, retinol and  $\alpha$ -tocopherol levels were reported in many insects across seasons, stages of development and age (in days) (Karpunina, 1971; Giovannucci and Stephenson, 1999; Kara, 2013) and in some case were postulated to be diet related. In our study, special care was taken to capture bees on frames without brood to ensure roughly similar age, but turnover rate or longevity of bees was not monitored. To consider age, operculated frames could have been kept in incubator in order to monitor and mark newly hatched bees. In turn, tagged individuals would be captured for the exposure period. Knowing that, bees from IMI



and THM exposure could slightly differ in ages and thus, in contents. Also, considering the shift in flowering crops between mid-July and end of July in Quebec (Chabot, 1948) and the variation of pollen constituent (carotenoids and lipids) across plant species and seasons (Mărgăoan *et al.*, 2014), such variations were not unexpected. These reasons could explain the differences in retinol, carotenoids, tocopherol and triglycerides between control bees from both exposures (THM and IMI), but not the differences across concentrations within the same exposure. If different dietary sources were responsible for dissimilar levels of antioxidants (pro) vitamins between control honeybees, poorer diets in such compounds could have resulted in higher TBARs levels in control honeybees for THM exposure. Consequently, and since exposures for IMI and THM were not performed in parallel during summer, it was crucial to compare compounds levels to their relative controls.

While many observational studies reported deranged processes in insects exposed to NEOCs such as impaired mobility, memory/learning capacities and orientation (see Decourtye and Devillers, 2010 for review) as well as immunity (James and Xu, 2012; Di prisco *et al.*, 2013; Brandt *et al.*, 2016), there is a consistent lack of biochemical investigations limiting the mechanistic understanding of such observations. Some rather interesting insights suggest that these NEOCs-induced disorders (memory and immunity) could be mediated by the retinoids as these compounds were recently linked to establishment of long-term memory in snails (Rothwell *et al.*, 2014) and the composition of gut microflora in mice (Pantazi *et al.*, 2016). In fact, gut microflora was recently proposed as a primary immune and would be crucial in honeybee for defense mechanism against microsporidium (Dussaubat *et al.*, 2012). Finally, recent publications highlight the influence of retinoid in insect larval and pupal stages. Their implication in insect's development is advising early damages that could ultimately affect adult honeybees, but its retinoid metabolism through development is unknown. Although we did not investigated possible effects on larvae, Tavares *et al.* (2015) observed developmental abnormalities and early cell death in optical lobes following



THM exposure. This loss of neurons, if not re-established during metamorphosis, is said to possibly affect the orientation of honeybees. Alternatively, the slight diminution in RALD contents after IMI exposure could affect the rhodopsin synthesis and compromise the visual process of honeybees, also contributing to the disorientation. Honeybee's larvae consume pollen and nectar and most of adult bees feed exclusively on nectar (Rortais *et al.*, 2005) which means that they could be exposed to these chemicals for prolonged period of time and at different stages of development. Consequently, it is fair to think that neonicotinoids could affect vision through different mechanisms.

### 3.5 Conclusion

To our knowledge, this study is the first to identify and quantify several retinoids in *A. mellifera* and to raise concern about the NEOC-induced physiological consequences on these compounds. Chronic toxicity assessment with technical grade insecticides contributes to better documentation of their sole toxicity and for this reason, the ecotoxicological implications of these results are rather conservatives. Further tests with commercial formulations should be undertaken to get a more representative picture of a typical exposure with effects of additives. Honeybees exposed for 10 days to environmentally relevant concentrations of technical grade neonicotinoids exhibited a dose dependent decrease in  $\alpha$ -carotene, 13-*cis* RA, ROL and  $\alpha$ -tocopherol conjointly with a dose dependent increase in lipid peroxidation. At this point, we do not know when these effects took place nor in which bee's compartments or organs. But, considering the presence of NEOCs in natural environment, it would be correct to expect similar disorders in honeybees exposed to IMI or THM through their regular activities. In regard to the broad role of retinoids in insects, we believe that the retinoids deserve further investigations in larval and pupal honeybee's stages.

### 3.6 Acknowledgement

The authors would like to thank Isabelle Lecavalier-Mondor for HPLC-UV analysis and to Reine-Nadia Bontsong A Maben for triglycerides analysis from Université du Québec à Montréal. This study was supported by scholarships attributed to M. Gauthier (Bourse d'excellence Lucie St-Martin and Canadien Pacifique (2015/6), FARE and Biological Sciences Department (2013/4-2014/5) all awarded from University du Québec à Montréal's foundation), by Centre de Recherche TOXEN, UQAM, grant to J. Paquin and M. Boily and by NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada), Discovery grant to M. Boily.

### 3.7 References

- Abou-Donia, M. B., Goldstein, L. B., Bullman, S., Tu, T., Khan, W, Dechkovskaia, A. M. and Abdel-Rahman, A. (2008). Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 71(2), 119–30.
- Albalat, R. (2009). The retinoic acid machinery in invertebrates: ancestral elements and vertebrate innovations. *Molecular and cellular endocrinology*, 313, 23–35.
- Albalat, R. and Cañestro, C. (2009). Identification of Aldh1a, Cyp26 and RAR orthologs in protostomes pushes back the retinoic acid genetic machinery in evolutionary time to the bilaterian ancestor. *Chemico-biological interactions*, 178(1-3), 188–96.
- Babino, D., Golczak, M., Kiser, P. D., Wyss, A., Palczewski, K. and von Lintig, J. (2016). The Biochemical Basis of Vitamin A3 Production in Arthropod Vision. *ACS Chemical Biology*, 11, 1049–1057.
- Badiou-Bénéteau, Alexandra, Carvalho, S. M., Brunet, J.-L., Carvalho, G. a, Buleté, A., Giroud, B. and Belzunces, L. P. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and environmental safety*, 82(-), 22–31.
- Bal, R., Naziroğlu, M., Türk, G., Yilmaz, Ö., Kuloğlu, T., Etem, E. and Baydas, G. (2012). Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell biochemistry and function*, 30(6), 492–9.
- Belyaeva, O. V, Lee, S., Kolupaev, O. V and Kedishvili, N. Y. (2009). Identification and Characterization of Retinoid-Active Short-Chain Dehydrogenases/Reductases in *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(10), 1266–1273.
- Blacquièrè, T., Smagghe, G., van Gestel, C. a M. and Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology (London, England)*, 21(4), 973–92.

- Blaner, W. S. (2001). Cellular metabolism and actions of 13-cis retinoic acid. *Journal of American Academy of Dermatology*, 45(5), 129–135.
- Boily, M., Sarrasin, B., Deblois, C., Aras, P. and Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental science and pollution research international*, 20(8), 5603–14.
- Bonmatin, J. M., Marchand, P. a, Charvet, R., Moineau, I., Bengsch, E. R. and Colin, M. E. (2005). Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5336–41.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M. and Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 86, 40–47.
- Chabot, J. N. (1948). *Plantes mellifères du Québec* (p. 1–8).
- Campbell, P. G. C, E. Pelletier et F. Denizeau (2004) Écotoxicologie moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement. Presses de l'université du Québec à Montréal. 462 pages.
- Chauzat, M.-P., Martel, A.-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P. and Faucon, J.-P. (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 30(1), 103–11.
- Decourtye, A. and Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Advances in experimental medicine and biology*, 683,85–95.
- Derecka, K., Blythe, M. J., Malla, S., Genereux, D. P., Guffanti, A., Pavan, P., Moles, A., Snart, C., Ryder, T., Otori, C. A., Barrett, D. A., Schuster, E. and Sto, R. (2013). Transient Exposure to Low Levels of Insecticide Affects Metabolic Networks of Honeybee Larvae, *Plos One*, 8(7), e68191.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E. and Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194–200.



- Di prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E. and Nazzi, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46), 18466–18471.
- Dondero, F., Negri, A., Boatti, L., Marsano, F., Mignone, F. and Viarengo, A. (2010). Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *The Science of the total environment*, 408(18), 3775–86.
- Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J.-H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L. P., Moritz, R. F. a, Le Conte, Y. and Alaux, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PloS one*, 7(5), e37017.
- Felton, G. W. and Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 29, 187–197.
- Ford, K. A., Gulevich, A. G., Swenson, T. L. and Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid Insecticides : Oxidative Stress in Planta and Metallo-oxidase Inhibition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4860–4867.
- Gauthier, M., Aras, P., Jumarie, C. and Boily, M. (2015). Low dietary levels of Al, Pb and Cd may affect the non-enzymatic antioxidant capacity in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Chemosphere*, 144, 848–854.
- Ge, W., Yan, S., Wang, J., Zhu, L., Chen, A. and Wang, J. (2015). Oxidative stress and DNA damage induced by imidacloprid in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(6), 1856-62.
- Giovannucci, D. R. and Stephenson, R. S. (1999). Identification and distribution of dietary precursors of the *Drosophila* visual pigment chromophore : analysis of carotenoids in wild type and *ninaD* mutants by HPLC, 39, 219-229.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, Mori, N., Marzaro, M., Di Bernardo, Greatti, M., Giorio, C. and Tapparo A. (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of economic entomology*, 102(5), 1808–15.

- Giroux, I. (2015). *Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya – 2011 à 2014* (p. 47).
- Goldsmith, T. H. (2013). Evolutionary tinkering with visual photoreception. *Visual neuroscience*, 30, 21–37.
- Gregorc, A. and Ellis, J. D. (2011). Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2), 200–207.
- Halme, A., Cheng, M. and Hariharan, I. K. (2010). Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Current biology*, 20(5), 458–463.
- Han, P. (2010). Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee. *Ecotoxicology*, 1612–1619.
- Hedrei-Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C. and Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental science and pollution research international*, 22, 8010–8021.
- James, R. R. and Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity, *Journal of invertebrate pathology* 109, 175–182.
- Jentzsch, A. M., Bachmann, H., Fürst, P. and Biesalski, H. K. (1996). Improved analysis on malondialdehyde in human body fluids. *Free radical biology & medicine*, 20(2), 251–256.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. and Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2897–908.
- Kapoor, U., Srivastava, M. K., Bhardwaj, S. and Srivastava, L. P. (2010). Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its No Observed Effect Level (NOEL). *The Journal of toxicological sciences*, 35(4), 577–81.
- Kara, T. (2013). Seasonal variation of vitamin and sterol content in chironomidae larvae. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(22), 1579–1583.

- Karpunina N. N. (1961) Changes in carotenoid content in the body of Colorado potato beetle during imaginal life (in Russian). *Dokl. Akad. Nauk U.S.S.R.* 137; 961-963
- Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M. F. and Lintig, J. Von. (2002). A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*, 99(16), 10581-10586.
- Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M. and Kawano, H. (2012). Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PloS one*, 7(2).
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G. and Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PloS one*, 7(1), e29268.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Mougeot, F. and Mateo, R. (2015). Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environmental research*, 136, 97–107.
- Main, A. R., Headley, J. V, Michel, N. L., Cessna, A. J. and Morrissey, C. A. (2014). Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. *Plos One*, 9(3), e92821.
- Malev, O., Klobučar, R. S., Fabbretti, E. and Trebše, P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae Desmodesmus subspicatus and amphipod Gammarus fossarum. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(3), 178–186.
- Mărgăoan, R., Mărghitaş, L. Al, Dezmirean, D. S., Dulf, F. V, Bunea, A., Socaci, S. A. and Bobiş, O. (2014). Predominant and Secondary Pollen Botanical Origins Influence the Carotenoid and Fatty Acid Profile in Fresh Honeybee-Collected Pollen. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62, 6306–6316.
- Mohany, M., El-feki, M., Refaat, I., Garraud, O. and Badr, G. (2012). Thymoquinone ameliorates the immunological and histological changes induced by exposure to imidacloprid insecticide. *The Journal of toxicological sciences*, 37(1), 1–11.



- Morakchi, S., Maïza, A., Farine, J. P., Aribi, N. and Soltani, N. (2005). Effect of a neonicotinoid insecticide (acetamiprid) on acetylcholinesterase activity and cuticular hydrocarbons profil in german cockroaches. *Communications in agricultural and biological sciences*, 70(4), 843–848.
- Mullin, C. a, Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., Vanengelsdorp, D. and Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS one*, 5(3), e9754.
- Nakamura, A., Stiebler, R., Fantappi , M. R., Fialho, E., Masuda, H. and Oliveira, M. F. (2007). Effects of retinoids and juvenoids on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Acta tropica*, 103(3), 222–30.
- Nauen, R., Ebbinghaus-kintscher, U. and Schmuck, R. (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* ( Hymenoptera : Apidae ). *Pest management science*, 57, 577–586.
- N mec, V., Kodrik, D., Matolin, S. and Lauferg, H. (1993). Juvenile Hormone-like Effects of Retinoic Acid in Insect Metamorphosis, Embryogenesis and Reproduction. *Journal of insect physiology*, 39(12), 1083–1093.
- Oberhauser, V., Voolstra, O., Bangert, A., von Lintig, J. and Vogt, K. (2008). NinaB combines carotenoid oxygenase and retinoid isomerase activity in a single polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 19000–19005.
- OECD. (1998). *Ligne directrice de l'ocde pour les essais de produits chimiques* (p. 1–8).
- Pantazi, E., Marks, E., Stolarczyk, E., Lycke, N. and Noelle, R. J. (2016). Retinoic acid signaling in B-cells is essential for oral immunization and microflora composition. *journal of immunology*, 195(4), 1368–1371.
- Reboul, E. (2013). Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*, 5(9), 3563–3581.
- Rodrigues, K. J. a, Santana, M. B., Do Nascimento, J. L. M., Pican o-Diniz, D. L. W., Mau s, L. a L., Santos, S. N., Ferreira, V. M. M., Alfonso, M., Durán, R. and Faro, L. R. F. (2010). Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(1), 101–7.



- Rortais, A., Arnold, G. and Halm, M. (2005). Original article Modes of honeybees exposure to systemic insecticides : estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees 1. *Apidologie* 36, 36, 71–83.
- Rothwell, C. M., Simmons, J., Peters, G. and Spencer, G. E. (2014). Neurobiology of Learning and Memory Novel interactive effects of darkness and retinoid signaling in the ability to form long-term memory following aversive operant conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 114, 251–263.
- Schneider, C. W., Tautz, J., Grünewald, B. and Fuchs, S. (2012). RFID Tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of Apis mellifera. *PloS one*, 7(1), e30023.
- Schulte, F., Ma, J., Kroh, L. W., Panne, U. and Kneipp, J. (2009). Characterization of Pollen Carotenoids with in situ and High-Performance Thin-Layer Chromatography Supported Resonant Raman Spectroscopy, *Analytical chemistry*, 81(20), 8426–8433.
- Tavares, D. A., Roat, T. C., Carvalho, S. M., Cristina, E., Silva-Zacarin, E. C. M. and Malaspina, O. (2015). In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee Apis mellifera (Hymenoptera : Apidae). *Chemosphere*, 135, 370–378.
- Wu, J. Y., Anelli, C. M. and Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (Apis mellifera) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.
- Yeum, K.-J., Dos Anjos Ferreira, A. L., Smith, D., Krinsky, N. I. and Russel, R. M. (2000). The effect of alpha-tocopherol on the oxidative cleavage of beta-carotene. *Free radical biology & medicine*, 29(2), 105–114.



## CONCLUSION

Le but de ce travail était de documenter les désordres entraînés par une exposition chronique à certains ÉTM et néonicotinoïdes chez l'abeille domestique à des concentrations retrouvées dans l'environnement. Parallèlement, il était attendu d'investiguer certains systèmes de réponses à ces contaminants dans l'optique de développer des biomarqueurs. Pour ce faire, des abeilles ont été exposées durant 10 jours à l'Al, au Pb et au Cd ainsi qu'à l'IMI et au THM (produits purs). Les résultats obtenus ont permis de mettre en lumière les potentiels désordres entraînés par de telles expositions.

D'une part, les résultats publiés dans la revue *Chemosphere* présentent des ratios de bioconcentration élevés pour le plomb et le cadmium indiquant qu'aux concentrations testées, ils ont été retenus presque entièrement par les abeilles. Cependant, bien que l'aluminium ait été faiblement retenu, il a tout de même montré qu'il pouvait augmenter la peroxydation des lipides chez les abeilles exposées. Finalement, le plomb et le cadmium ont entraîné à la hausse les niveaux d' $\alpha$ -tocopherol, et le cadmium uniquement a stimulé la production de MTLPs. Ces résultats soulignent la menace additionnelle que posent les ÉTM sur la santé des abeilles domestiques. De plus, comme préconisent déjà certains auteurs, nos résultats suggèrent que cette espèce puisse être utilisée comme bio-indicatrice dans un contexte de contamination métallique.

Les résultats obtenus dans l'article en préparation montrent plusieurs désordres à la suite à une exposition chronique d'IMI et de THM (produit pur). Effectivement, l'IMI a entraîné à la hausse les niveaux d' $\alpha$ -tocophérol ainsi que les niveaux d' $\alpha$ -carotène. De plus, une exposition au THM a provoqué une diminution dans les niveaux d'AR 13-*cis* et de ROL. À ces concentrations, une augmentation de la peroxydation des lipides a aussi été observée. Toutefois, les analyses biochimiques ciblant l'AChE n'ont pas permis l'identification de désordres dans le fonctionnement de cette enzyme suggérant que les concentrations testées étaient sous le seuil susceptible d'entraîner des effets sur cette enzyme. Ces résultats présentent une avenue intéressante pour la mise au point de biomarqueurs à base de rétinoïdes chez l'abeille domestique.

L'ensemble de ces résultats illustre les risques posés par les métaux et les insecticides sur la santé de l'abeille domestique aux concentrations que l'on retrouve dans l'environnement, mais présentent aussi l'abeille domestique comme espèce sentinelle prometteuse dans des cas de contamination agricole.

Il est important de noter que cette étude ne s'est pas intéressée aux effets potentiels d'une exposition durant le développement larvaire ou ceux qui sont observables à plus long terme (>10 jours). Le premier aspect pourrait faire l'objet d'investigations futures en s'intéressant aux désordres entraînés par une exposition durant le stade larvaire. De plus, les résultats obtenus à la suite aux expositions avec insecticides doivent être considérés avec réserve puisque des tests avec les formulations commerciales devraient aussi être effectués afin de mieux statuer sur les effets susceptibles de produire dans l'environnement. Des expositions avec des mélanges insecticides-ÉTMs devraient aussi être tentées.

Cette étude est la première à présenter cet éventail d'espèces rétinoïdes chez l'abeille domestique et à démontrer des perturbations dans les niveaux de ces composés à la



suite d'une exposition aux néonicotinoïdes. Dans ce sens, une initiative pourrait être prise afin d'investiguer le métabolisme des rétinoïdes sous-jacent aux résultats obtenus. Par exemple, il serait sage de développer nos connaissances relativement aux enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine A chez l'abeille domestique. En parallèle, il serait complémentaire d'étudier la modulation de l'activité de NinaB chez certains insectes modèles comme *D. melanogaster*, *A. Gambiae* et *A. mellifera* lorsqu'une exposition à certains insecticides néonicotinoïdes est réalisée.

Considérant la rareté des investigations biochimiques à la suite à des expositions chroniques, ces travaux présentent un aspect nouveau et complémentaire aux connaissances actuelles sur la toxicité des contaminants agricoles sur *A. mellifera* et amènent de nouveaux aspects à considérer dans l'évaluation du risque que posent les contaminants agricoles sur la santé de l'abeille domestique et des autres populations de pollinisateurs. Il s'avèrerait donc très prometteur et pertinent de poursuivre ces recherches dans un contexte de toxicologie environnementale afin de développer des outils biomarqueurs chez l'abeille domestique.



## APPENDICE A

### MISES AU POINT DES TESTS DE TOXICITÉ DES NÉONICOTINOÏDES SUR LA LIGNÉE CELLULAIRE EMBRYONNAIRE P19

Cette section fait état des travaux exécutés jusqu'à maintenant avec la lignée cellulaire embryonnaire P19. Le développement du système nerveux est brièvement présenté chez les mammifères et chez les insectes en démontrant l'importance de la reeline dans ces processus. Le fonctionnement du système cholinergique est ensuite expliqué afin de souligner le rôle de l'AChE. Finalement, les mises au point effectuées avec la lignée cellulaire embryonnaire P19 sont présentées dans l'optique de développer des tests de neurotoxicité des néonicotinoïdes sous leurs formes pures et commerciales (IMI, THM et la CLO).

## A.1 Introduction

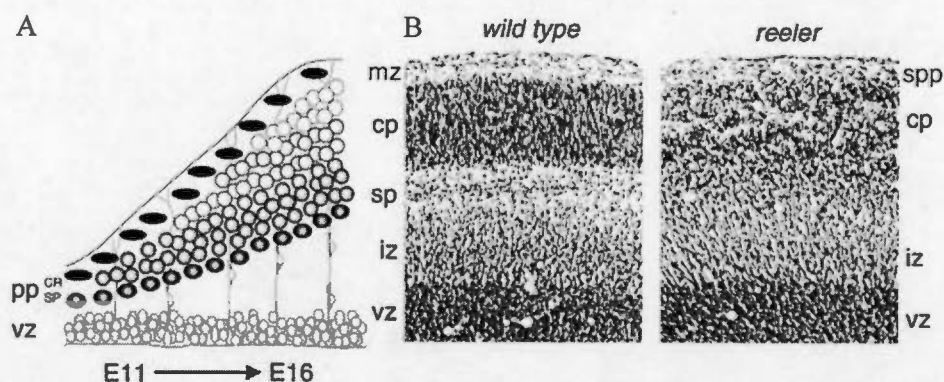
### A.1.1 Neurogénèse embryonnaire chez les mammifères

La gastrulation est le phénomène durant lequel un embryon passe d'un feuillet bilaminaire (épiblaste et hypoblaste) à un feuillet trilaminaire (ectoderme, mésoderme et endoderme). Ce sont des cellules de l'ectoderme qui, au cours de la neurulation, se différencient afin de donner naissance à l'ébauche du système nerveux central. Les parois du tube neural se divisent radialement en trois zones ; la zone ventriculaire, la zone intermédiaire et la sous-plaque corticale qui sera amenée à disparaître dans les stades tardifs du développement. Ce sont les cellules neuroépithéliales de la zone ventriculaire qui donneront naissance à des neuroblastes pouvant se différencier en neurones (Figure A.1). Les neuroblastes migrent vers les cellules de Cajal-Retzius afin de générer progressivement de nouvelles strates. Chaque cohorte de neuroblastes migratoires migrent au-delà de la cohorte précédente. À la fin du processus, ce sont les neuroblastes nés les derniers qui seront les plus près de la surface corticale. Ces migrations et positionnements cellulaires sont cruciaux afin de permettre la stratification de différentes parties du cerveau comme le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet. Ce n'est qu'une fois bien migrée et positionnée que la cellule neuroblastique pourra se différencier en neurone (Rice et Curran, 2001).

#### Implication de la reeline

La reeline est une glycoprotéine exprimée par une population cellulaire très précoce qui se situe en bordure de la surface externe du cortex ; les cellules de Cajal-Retzius (Rice et Curran, 2001). La reeline possède 3461 acides aminés et son poids approximatif est de 400 kDa. Elle est sécrétée majoritairement durant l'embryogenèse et de façon constitutive après le développement embryonnaire. Sa séquence d'acides aminés présente un motif semblable au facteur de croissance épidermique (EGF) répété 8 fois et une séquence similaire à 28% avec la F-spondine qui elle, est responsable de





**Figure A.1** Vue simplifiée de la corticogénèse chez des mammifères (Rice et Curran, 2001). (A) La corticogénèse commence avec l'apparition de la préplaque (pp) qui se retrouve exactement au-dessus de la zone ventriculaire (vz) et contient les cellules Cajal-Retzius (CR) ainsi que les neurones de la sous-plaque corticale (SP). La première cohorte de cellules de la plaque corticale migre à travers la sous-plaque corticale jusqu'aux cellules de Cajal-Retzius de la zone marginale (mz). Les cohortes de cellules suivantes migrent à travers les strates déjà créées et se positionnent à leur tour devant les cellules de Cajal-Retzius épaississant ainsi le tube neural. Six couches neuronales sont ainsi générées. (B) Histochemie des couches neuronales chez la souris de type sauvage et chez la souris de type *reeler*.

l'adhésion cellulaire et de la croissance des neurites (Curran et D'Arcangelo, 1998). La reeline, bien conservée dans l'évolution, présente une homologie de 94,8% entre les formes humaine et murine (Quattrocchi *et al.*, 2002). Elle est clivée à deux endroits afin de former des fragments respectifs de 300 et 180 kDa (Jossin *et al.*, 2003).

Selon des études menées sur les voies de signalisation de la reeline, ses récepteurs seraient les récepteurs de VLDL, l'ApoER2 et l' $\alpha 3 \beta 1$ -intégrine (D'Arcangelo *et al.*, 1999 ; Hiesberger *et al.*, 1999; Dulabon *et al.*, 2000). La voie de signalisation intracellulaire incluant la phosphorylation d'une protéine nommée Dab-1 permettrait le bon déroulement de la migration et du positionnement des neurones (Quattrocchi *et al.*, 2002). Afin d'étudier l'incidence d'une absence de reeline, des équipes ont travaillé sur un modèle murin déficient en cette protéine qui a été nommé le modèle *reeler*. Plusieurs anomalies nerveuses ont été observées chez ces mutants, notamment un désordre dans l'organisation laminaire corticale (Figure A.1), un positionnement anormal des neurones, une mauvaise orientation des fibres nerveuses et un développement insuffisant du système nerveux (Caviness, 1982). Ces désordres laissent présager d'un rôle vital de la reeline dans l'organisation et la migration des neurones. De plus, cette désorganisation pourrait être en partie responsable de maladies comme la schizophrénie, l'autisme ou encore la lissencéphalie, une maladie caractérisée par une absence de circonvolutions cérébrales au niveau du cortex. En effet, dans plusieurs cas de schizophrénie et d'autisme des baisses d'expression de la reeline ont été observées (Eastwood and Harrison, 2003 ; Fatemi, 2005 ; Guidotti *et al.*, 2016). Dans le cerveau adulte, elle serait impliquée dans le maintien de la plasticité synaptique et de la mémoire et un dérèglement dans sa sécrétion pourrait entraîner des pertes de fonctions neuronales (Levenson *et al.*, 2008).

### A.1.2 Neurogénèse des insectes

Peu d'études ont été publiées sur le développement du système nerveux chez les insectes et sur les protéines impliquées dans ce phénomène. Cependant, il est connu qu'un insecte holométabole comme l'abeille domestique subit une neurogénèse post-embryonnaire importante au niveau des lobes antennaires, des lobes optiques et des corps pédonculés durant son stade larvaire et pupal. Le développement des corps pédonculés serait reconnu comme un processus "inside-out", c'est-à-dire que les neuroblastes différenciés pousseraient les cellules plus âgées vers l'extérieur des corps pédonculés, plutôt que de migrer à travers pour aller former des strates externes (Farris *et al.*, 1999). Les recherches de Farris *et al.* (1999) décrivent aussi un processus de migration des petites cellules ganglionnaires mères à travers des grappes de neuroblastes avant de se diviser en cellules de Kenyon. Ces deux processus rappellent la migration des neuroblastes chez les mammifères. En parallèle, une protéine homologue impliquée dans la voie de signalisation de la reeline chez l'humain a été identifiée chez *Drosophila melanogaster*. La présence de cette protéine mDab-1 chez la drosophile, possédant les mêmes fonctions neuronales que la protéine Dab-1 chez les vertébrés, soulève l'existence possible de la reeline chez les insectes (Winder, 2004; Pramatarova *et al.*, 2006). Bien que comportant plusieurs différences, le résultat de cette neurogénèse chez l'abeille domestique serait aussi un arrangement structuré en fonction de l'âge cellulaire, comme chez les mammifères. Ces observations laissent croire que des protéines pourraient intervenir dans la régulation de la neurogénèse chez les insectes.

### A.1.3 Système cholinergique

L'organisation complexe du système nerveux permet la réception et l'intégration des informations ainsi que l'émission de réponse. Ce sont les

neurotransmetteurs qui s'acquittent de cette communication entre les différentes unités du cerveau. Autant chez les vertébrés que chez les invertébrés, lorsque l'influx nerveux se déplace le long de l'axone sous forme de dépolarisation et qu'il arrive au corpuscule terminal, il occasionne une entrée de calcium par des canaux à calcium voltage dépendants et déclenche la fusion de vésicules d'acétylcholine avec la membrane présynaptique. L'acétylcholine déversée dans la fente synaptique se lie alors rapidement de façon réversible à ses récepteurs situés sur la membrane postsynaptique et transmet la dépolarisation au neurone adjacent.

Il existe deux types de récepteurs qui répondent à l'acétylcholine, les récepteurs muscariniques ( $M_1$ - $M_5$ ) qui sont couplés avec des protéines G et qui déclenchent des cascades enzymatiques et les récepteurs nicotiniques ( $N_1$ - $N_2$ ) couplés à des canaux à sodium ligand-dépendants qui modifient le potentiel membranaire. Les récepteurs nicotiniques s'organisent au niveau du système nerveux central vertébré en sous-unités nommées  $\alpha 2$ -10 et  $\beta 2$ -4, les plus présents étant le  $\alpha 4\beta 2$  et le  $\alpha 7$  dans le cerveau humain. Chez l'humain, l'acétylcholine joue un rôle important dans l'apprentissage (Hasselmo, 2009). Afin de permettre l'arrêt de la transmission de l'influx nerveux, l'AChE hydrolyse l'acétylcholine en choline et en acétate. C'est d'ailleurs son rôle le mieux compris. Toutefois, l'AChE démontre aussi des rôles moins conventionnels comme son implication dans le développement et le maintien de synapse par son action de molécule adhésive (Silman et Sussman, 2005) ainsi que son implication dans la neuritogénèse (Koenigsberger *et al.*, 1997). Par ailleurs, en accentuant l'agglutination des peptides A $\beta$  en fibrilles  $\beta$ -amyloïdes, puis en plaques amyloïdes, l'AChE pourrait augmenter leur neurotoxicité et a été conséquemment associée à la maladie d'Alzheimer (Inestrosa *et al.*, 1996). Chez les insectes, la diversité et la structure des nAChRs n'est pas aussi bien connue, mais chez l'abeille, il y aurait 11 sous-unités au total (9 $\alpha$  et 2 $\beta$ ) parmi lesquelles quelques-unes seulement ont fait l'objet de publications (Jones *et al.*, 2006).



## A.2 Choix des variables à l'étude et pertinence du projet

### A.2.4 Reeline

À ce jour, aucune documentation n'existe sur l'effet des néonicotinoïdes sur l'expression de la reeline autant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Ce travail sera le premier à investiguer cette zone grise. La reeline joue un rôle crucial dans la neurogenèse plus particulièrement au niveau de la migration et du positionnement des cellules dans les strates du cerveau. La potentielle modulation des niveaux de reeline dans le modèle cellulaire P19 exposé à des néonicotinoïdes permettra de mieux statuer sur l'incidence des effets de ces insecticides sur le développement du système nerveux des vertébrés et dans le développement des maladies comme la schizophrénie, l'autisme et la lissencéphalie.

Une étude menée par Kumar *et al.* (2013) a montré que les niveaux de reeline pouvaient être modulés par une exposition *in utero* à la deltaméthrine, un insecticide neuroactif de la classe des pyréthroïdes reconnu pour augmenter la durée de l'ouverture des canaux à sodium voltage-dépendants dans les neurones. Ainsi, on serait en droit de se demander si les insecticides néonicotinoïdes agissant sur le maintien de la dépolarisation neuronale pourraient également entraîner des désordres sur les niveaux de reeline.

Grâce à la technique d'immunobuvardage (Western Blot), il sera possible de séparer cette protéine par électrophorèse dénaturante sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE), de la transférer sur membrane de polyvinylidène difluoré (PVDF) et de détecter les différentes formes (400, 300 et 180kDa) à l'aide de deux anticorps IgG de souris anti-reeline (G10) et POD-anti-IgG de souris). Cette méthode, déjà développée pour les milieux de cultures des neurones P19 en prétri de 30 ou 60 mm de diamètre, sera simplement adaptée pour les cultures de cellules P19 en plaque de 12 puits.

#### A.2.5 Lignée cellulaire embryonnaire P19

Dans le cadre de ce projet, le modèle cellulaire P19 a été sélectionné comme modèle pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, cette lignée cellulaire immortelle est faite de cellules très semblables aux cellules souches embryonnaires et donc idéale pour l'étude du stade embryonnaire (McBurney, 1993). Ce type de cellules se maintient facilement en culture autant sous leur stade indifférencié que différencié et leur différenciation en neurones est assez simple à induire avec l'AR (McBurney, 1993). De plus, comme le mentionnent Chen et Reese (2011), le modèle P19 possède une voie métabolique des rétinoïdes typique intéressante pour l'étude des rétinoïdes.

#### A.3 Pertinence du projet

Récemment, l'innocuité des néonicotinoïdes pour les vertébrés a été sérieusement remise en question à la suite de la publication d'études observant des actions neurotoxiques sur des modèles cellulaires mammifères et autres vertébrés. Chez le rat, des effets neurotoxiques ont été observés, entre autre, sur le système nerveux (Sheets *et al.*, 2016)) et au niveau du système cholinergique suite à une exposition au THM (diminution de l'activité AChE et de la captation d'acétylcholine) (Rodrigues *et al.*, 2010). Ce projet va s'attarder aux désordres neuronaux causés par les insecticides néonicotinoïdes chez une lignée cellulaire issue de vertébré et permettra l'approfondissement des connaissances de l'action neurotoxique des néonicotinoïdes. À la suite de ce travail, il sera possible de mieux comprendre l'implication cholinergique et neurodéveloppementale des néonicotinoïdes par le biais de la reeline ainsi que sur l'activité de l'AChE, autant chez les vertébrés que les invertébrés.

#### A.4 Mises au point des tests de neurotoxicité cellulaire

Les mises au point présentées résument le travail fait jusqu'à présent avec la lignée cellulaire embryonnaire P19 dans le but de développer des tests de neurotoxicité cellulaire des insecticides néonicotinoïdes.

##### A.4.6 Test de viabilité cellulaire MTT

Ce test de viabilité cellulaire repose sur la réduction du bromure de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) par une enzyme mitochondriale ; la succinate déshydrogénase. Le composé réduit précipite en formazan sous forme de cristaux violets qui peuvent être dissous dans le DMSO et lus en spectrophotométrie ( $A_{550\text{ nm}} - A_{664\text{ nm}}$ ). Dans ce cas, l'activité métabolique cellulaire est utilisée à des fins de marqueur de viabilité neuronale. La viabilité cellulaire est alors comparée avec celle du contrôle qui est fixé à 100%. Le protocole développé par l'équipe du laboratoire de Joanne Paquin avec la lignée cellulaire P19 a été légèrement modifié. Le protocole est appliqué à des cellules P19 une fois qu'elles ont été différenciées en neurones.

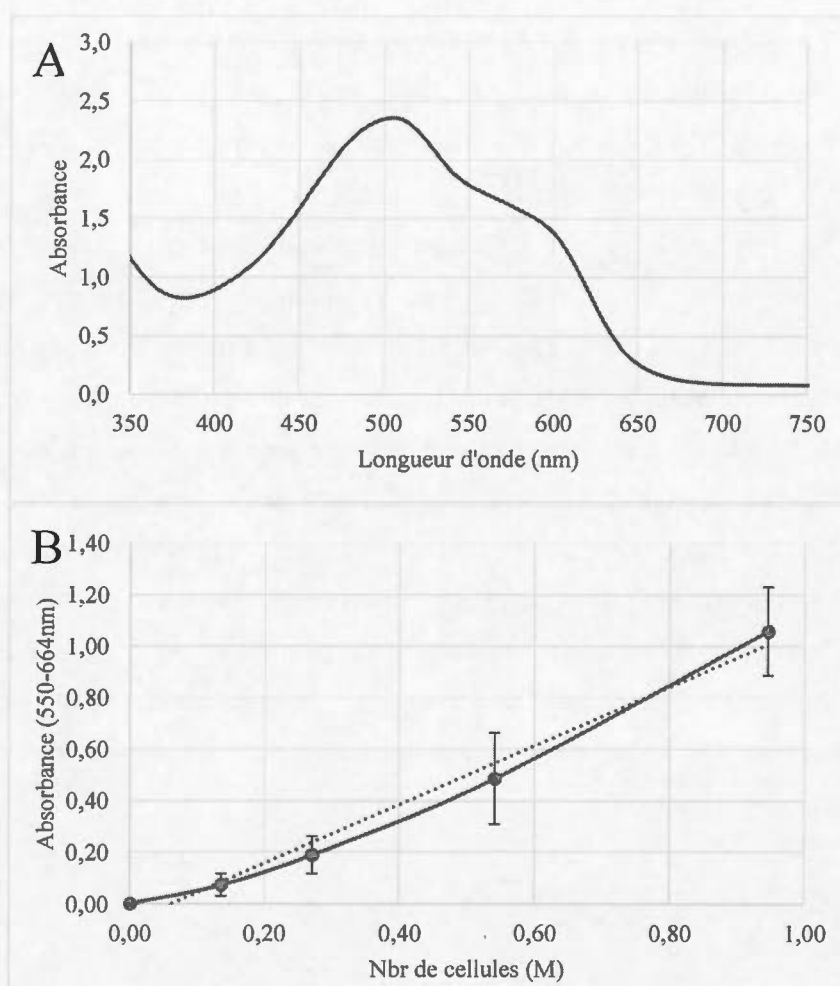
##### *Protocole :*

Brièvement, la différenciation neuronale a été effectuée par une exposition à l'AR pendant 4 jours telle que décrite par Ducharme *et al.* (2010). Au jour 4,  $1 \times 10^6$  cellules (neurones) sontensemencées dans chaque puits (plaque de 12 puits) préalablement gélatinisés. Au jour 6, les cellules sont rincées délicatement avec PBS et incubées 3 heures à 37°C avec 1ml de solution d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) salin enrichi (15 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 11 mM D-glucose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>) contenant 0,5mg/ml de MTT. Après incubation, il est possible d'observer la formation de cristaux violets précipités qui adhèrent à la plaque. La solution de HEPES enrichi est enlevée et les cellules sont

rincées délicatement avec PBS. Finalement, les cristaux sont dissouts dans 500  $\mu$ l de DMSO et 200  $\mu$ l sont prélevés (2x) et ajoutés à une plaque de 96 puits qui sera lue à 550nm (correction avec valeur à 664nm).

Une première amélioration a été d'utiliser un volume de 500  $\mu$ l de DMSO plutôt que de 1 ml pour solubiliser les cristaux et pour augmenter l'intensité de la coloration afin de mieux observer le signal du formazan à 550 nm. Cette amélioration visait à augmenter l'intensité de la coloration afin de mieux observer le signal du formazan à 550nm. Ensuite, la courbe spectrale du formazan a été faite (voir figure A.2 A). À ce sujet, il pourrait être intéressant de faire une lecture à 500nm et de corriger avec la valeur d'absorbance à 700nm afin de maximiser les valeurs d'absorbance enregistrées. Reste qu'une correction, qu'elle soit à 664nm ou 700nm, est souhaitable puisqu'elle améliore la linéarité de la courbe (résultats non présentés). Une courbe d'étalonnage a été effectuée pour estimer le nombre de cellules à ensemercer au jour 4 afin d'obtenir un signal acceptable et de s'assurer de ne pas atteindre un plateau dans la concentration de formazan ou dans la confluence neuronale au jour 6 (figure A.2 B). Les résultats de la figure A.2 B confirment qu'avec  $1 \times 10^6$  cellulesensemencées par puits au jour 4, le signal observé au jour 6 (48h plus tard) est linéaire avec le nombre de cellules. C'est donc ce nombre de cellules qui a été choisi pour les tests. À titre informatif, des essais avec un plus grand nombre de cellules à l'ensemencement ont montré que le signal commence à plafonner vers  $1,5 \times 10^6$  (résultats non présentés).

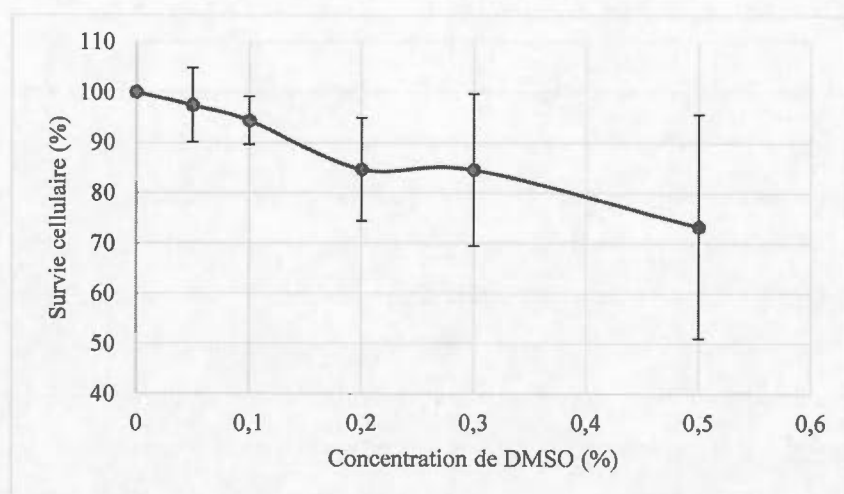




**Figure A.2** A) Courbe spectrale du formazan entre 350nm et 750nm (incrément = 10nm) effectuée à l'aide du spectrophotmètre (Infinite M1000 Quadruple Monochromator Microplate Reader, Tecan Group Ltd). B) Courbe d'étalonnage (n = 3) de la différence d'absorbance du formazan (550nm-664nm) en fonction du nombre de neurones P19ensemencées par puits au jour 4 (Équation :  $y = 1,1388x - 0,0669$ .  $R^2 = 0,9816$ ). Le test MTT a été réalisé au jour 6, après 48h de culture.

#### A.4.7 Courbe de survie cellulaire en présence de DMSO

Dans le but d'exposer les cellules à des insecticides dilués dans le DMSO (maximiser la solubilisation des composés), il a été nécessaire de déterminer une concentration de DMSO occasionnant une mortalité acceptable de cellules (<10%) et permettant un volume suffisant pour la dissolution des insecticides sous leur formes pures (IMI, THM et CLO). Pour ce faire, une courbe de survie au DMSO a été élaborée sur 48h (entre jours 4 et 6) à différentes concentrations de DMSO avec un nombre de  $1 \times 10^6$  cellules par puits. Ces expositions ont été suivies d'un test de viabilité cellulaire MTT (voir figure A.3). À la suite de ces tests, une concentration maximale de 0,2% de DMSO a été identifiée comme étant un seuil à ne pas dépasser afin d'effectuer les expositions aux insecticides. À des concentrations supérieures, les cellules avaient tendance à décoller de la surface du pétri occasionnant de grands écarts type. Aussi, le volume nécessaire de DMSO serait suffisant pour la dissolution des formes pures d'insecticides. Des courbes de mortalité sur 24h ont aussi été effectuées, mais le délai était insuffisant pour permettre l'adhérence et la neuritogénèse des cellules (résultats non présentés). Pour cette raison, des expositions de 48h ont été sélectionnées pour l'exposition aux insecticides.

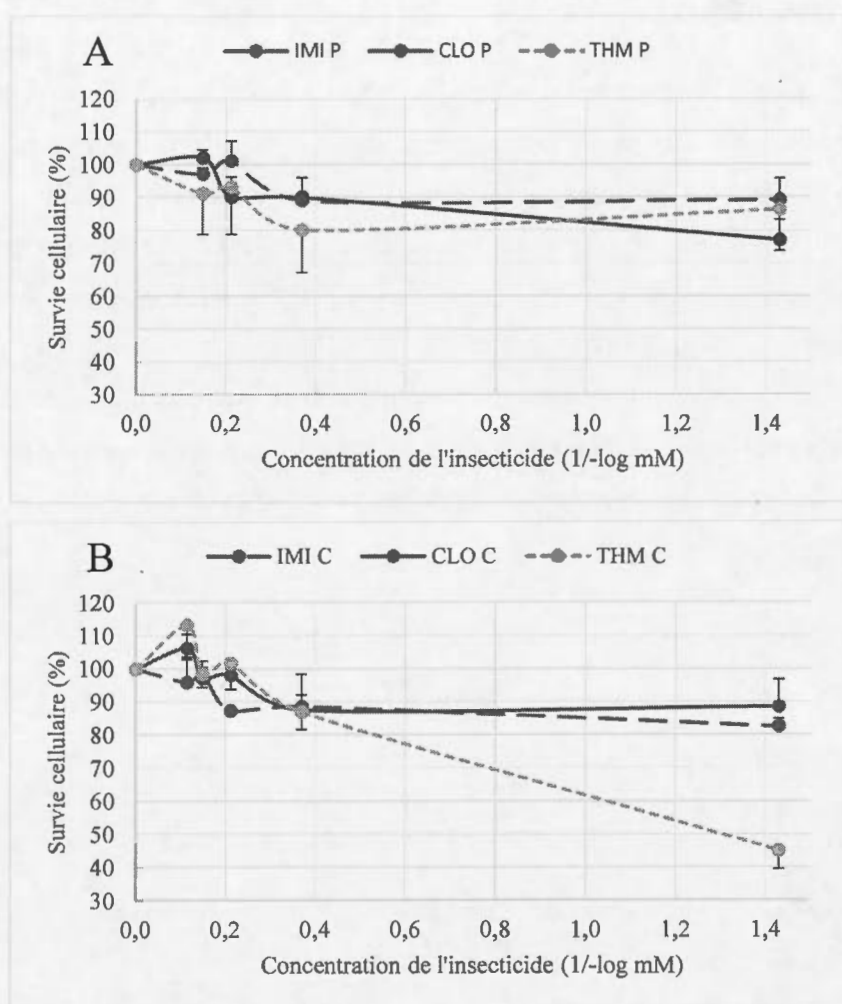


**Figure A.3** Courbe de survie de neurones P19 exposés durant 48h (entre jour 4 et 6) à différentes concentrations de DMSO (0-0,5% v/v). Le contrôle (sans DMSO) a été utilisé comme référence (100%) à la suite de tests de viabilité MTT ( $n = 4$  sauf pour point 0,3 et 0,5 où  $n = 3$ ). Un nombre de  $1 \times 10^6$  cellules par puits a été utilisé.

#### A.4.8 Courbe de survie cellulaire en présence d'IMI, de THM et de CLO en formes pure et formulation commerciale.

Ensuite, dans le but d'exposer la lignée cellulaire à des concentrations sous létales, une courbe de survie cellulaire a été effectuée pour l'IMI, le THM et la CLO sous leurs formulations pures et commerciales (respectivement, *Admire 240-IMI*, *Actara 240SC-THM* et *Titan ST-CLO*). Les formes pures ont d'abord été dissoutes dans le DMSO (pour assurer une dissolution complète) et la concentration finale de DMSO était fixée à 0,2%. Les formulations commerciales ont été dissoutes directement dans le milieu de culture, car elles sont élaborées de façon à être solubilisées dans l'eau par les producteurs agricoles. La gamme de concentrations testées pour les insecticides pures et commerciaux était 0,2 nM; 20 nM; 2 µM; 0,2 mM pour 48 heures (entre jour 4 et jour 6). Les tests ont été faits en duplicatas pour chaque n (voir figure A.4). Suivant ces tests, des concentrations maximales d'exposition ont été sélectionnées afin de respecter le critère de sous létalité (<10%) pour chaque composé. À la suite de ces expositions pour les produits purs, il est possible d'observer une survie cellulaire tout de même assez élevée aux concentrations les plus fortes, soit entre 80-90%. Cependant, pour les formulations commerciales, malgré une survie cellulaire similaire aux produits purs pour l'IMI et la CLO, le THM a entraîné une diminution marquée de la survie à environ 45% à la concentration la plus forte. En se basant sur cette information, une gamme de concentrations à tester a été établie en s'assurant d'y inclure les concentrations retrouvées dans les eaux du Québec pour ces composés (Giroux, 2015).

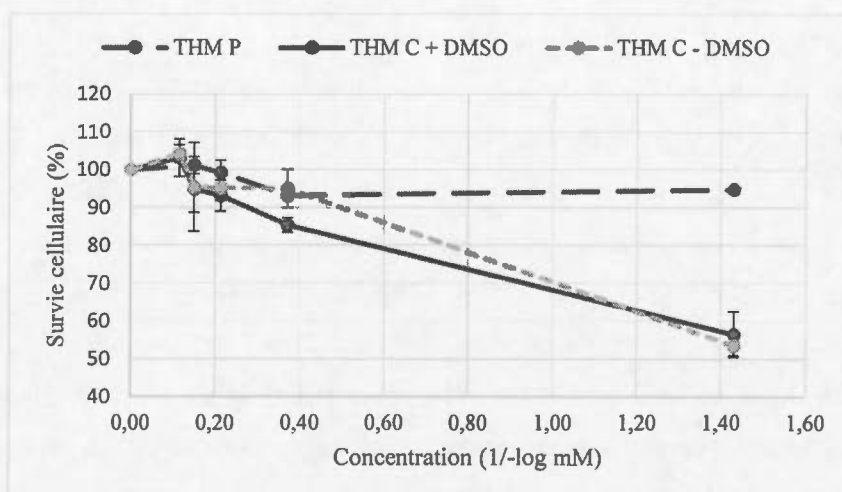




**Figure A.4** Courbes de survie cellulaire (%) pour des neurones P19 cultivés 48h en présence de différentes concentrations (1/-log mM) d'IMI, de THM et de CLO A) Produits purs (P) et B) Formulations commerciales (C). Les produits purs étaient dissous dans DMSO (concentration finale= 0,2%) et comparés au contrôle (véhicule seulement) tandis que les formulations commerciales étaient dissoutes dans le milieu de culture directement et comparées avec le contrôle sans DMSO à la suite de tests de viabilité MTT ( $n = 3$ ). Un nombre de  $1 \times 10^6$  cellules par puits a été utilisé.

#### A.4.9 Courbe de survie cellulaire en présence de THM pur et commercial (avec et sans DMSO)

Afin de s'assurer que la présence de DMSO n'altère pas la toxicité de l'insecticide en solution, un test supplémentaire a été effectué afin d'exposer les neurones P19 à l'insecticide présentant l'effet le plus marqué sur la viabilité cellulaire ; le THM. Dans ce test, il a été déterminé si la présence de DMSO affectait la viabilité cellulaire lorsque les cellules étaient exposées au THM sous formulation commerciale. Ainsi, des expositions de 48 heures ( $n = 3$ ) ont été reprises en exposant les cellules au THM pure, et commercial (avec ou sans DMSO) (voir figure A.5). Cela a permis de conclure que la présence de DMSO n'a pas d'effet notable sur la viabilité cellulaire à une concentration de 0,2% lorsque les cellules sont co-exposées au THM commercial.

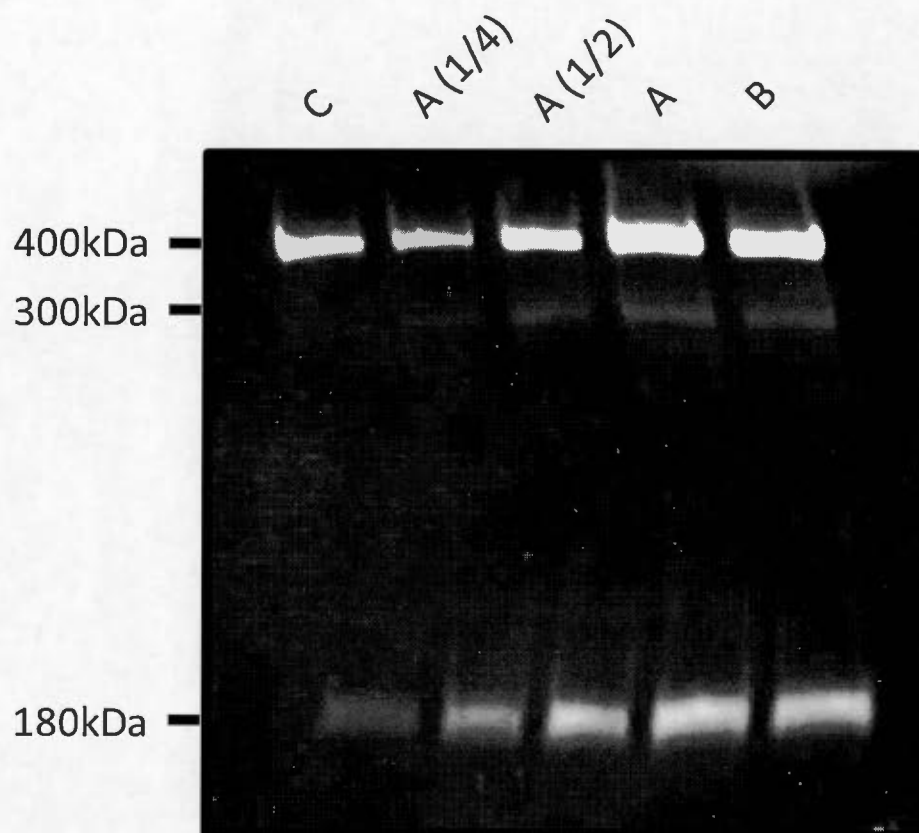


**Figure A.5** Courbes de survie cellulaire (%) pour des neurones P19 cultivés en présence de différentes concentrations de THM (1/-log mM) pur (P) ou commercial avec DMSO (C+DMSO) et sans DMSO (C-DMSO). Le THM pure et commercial (avec DMSO) étaient dissous dans DMSO (concentration finale= 0,2%) et les valeurs d'absorbance des différentes concentrations étaient comparées à leur contrôle respectifs tandis que la formulation commerciale (sans DMSO) était dissoute dans le milieu de culture directement et comparée avec son contrôle. Un nombre de  $1 \times 10^6$  cellules par puits a été utilisé en duplicata à la suite des tests de viabilité MTT ( $n = 3$ ).

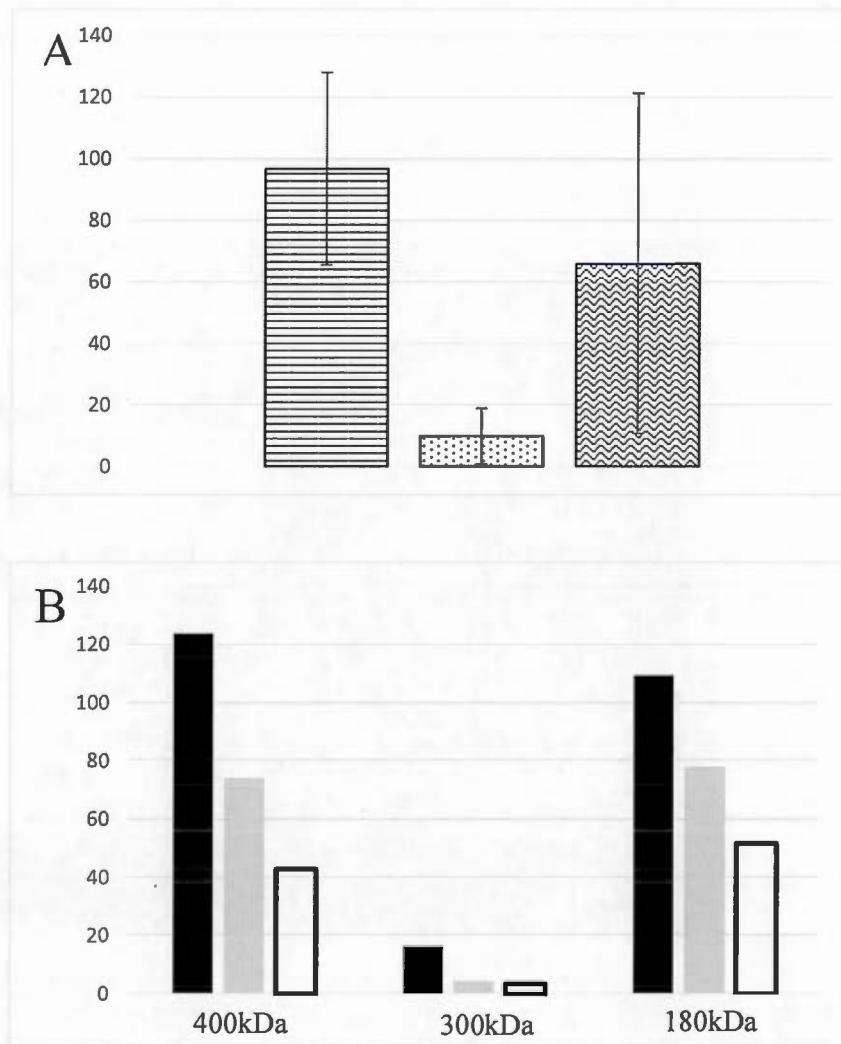
#### A.4.10 Quantification de la reeline

Un premier immunobuvardage de type western a été effectué sur des cultures de neurones P19 (jour 6) afin de déterminer les dilutions du milieu de culture à effectuer pour les mesures de la reeline sous ses trois formes (400, 300 et 180 kDa). Puisque la reeline est une protéine extracellulaire et qu'elle est sécrétée dans le milieu interstitiel, il est donc aisé de prélever un volume de milieu de culture au jour 6 afin d'effectuer la détection. Étant donné la taille de la protéine, aucun marqueur de poids moléculaire n'est présenté, mais cette manipulation de routine dans le laboratoire de J. Paquin est bien connue et les trois bandes de reeline sont aisément identifiables. Le protocole utilisé pour le dosage de cette protéine a été développé par l'équipe de Joanne Paquin et est une version améliorée de celle présentée par (Ducharme *et al.*, 2010). Les résultats illustrés dans la figure A.6 ne sont qu'un premier test afin de préciser la dilution à utiliser avec les cultures neuronales et visait à s'assurer du fonctionnement de la méthode (voir aussi figure A.7). Ces résultats confirment que la reeline est bel et bien détectée aux densités cellulaires utilisées. Dans ce cas, aucune dilution du milieu de culture ne sera nécessaire. Ainsi, cette méthode serait utilisable afin de détecter des variations de niveaux de reeline dans les cultures de neurones P19 exposées à différentes concentrations de néonicotinoïdes.





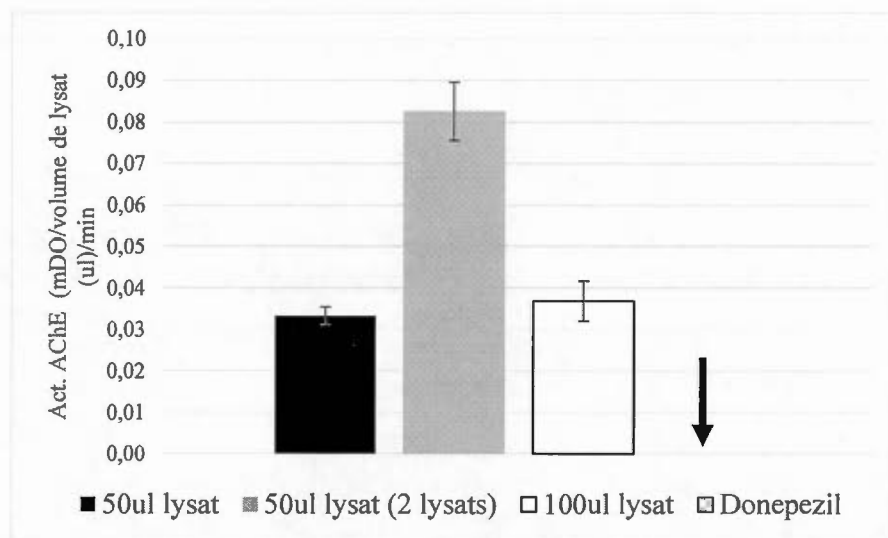
**Figure A.6** Immunobuvardage de type western des différents fragments de la reeline (180 et 300 et 400kDa) produite par des neurones P19 (jour 6) dans 3 cultures indépendantes (A, B et C). L'échantillon A a été dilué (FD2 et FD4). La méthode expérimentale utilisée est une version améliorée de celle décrite par Ducharme et al., (2010). Les anticorps utilisés étaient 1<sup>er</sup> anti-reeline (G10) et 2<sup>e</sup> POD-anti-igG de souris.



**Figure A.7** A) Analyses densitométriques des différents fragments de reeline (180, 300 et 400kDa) pour 3 cultures indépendantes (▨ = 400kDa, ▩ = 300kDa et ▤ = 180kDa) et B) Dilution nécessaire pour la détection de la reeline dans les milieux de culture des neurones P19 au jour 6 (■ = FD1, ■ = FD2 et □ = FD4). Les mesures ont été prises avec le logiciel imageJ 1.50e à partir de la figure A.6 en soustrayant une valeur contrôle dans la piste de migration.

#### A.4.11 Mesure de l'activité de l'AChE

Cette section présente les premiers résultats issus des dosages de l'activité de l'AChE dans les lysats de neurones P19. Le protocole adapté d'Ellman *et al.* (1961) et utilisé pour mesurer l'activité de cette enzyme en microplaque est présenté dans le chapitre 3. Au jour 6, après avoir aspiré le milieu de culture, les neurones adhérents d'un puits (plaque de 12 puits) sont rincés au PBS et récoltés dans 300 µl de LST (10 mM NaCl, 1% m/v triton X-100, 15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3). Des lysats doubles (issus de la récolte du contenu de 2 puits) sont aussi prélevés pour le dosage. Après 3 min de bain à ultrasons, une centrifugation de 10 min à 12 000g (4°C) est effectuée. La thiocholine issue du clivage de l'acétylthiocholine par AChE réagit avec le DTNB afin de créer un produit coloré (jaune). La réaction est suivie durant 40 min à 412 nm et la différence d'absorbance est effectuée entre la valeur à 40 min et celle à 5 min. L'activité est présentée de façon préliminaire en tant que mDO/volume de lysat/min, mais sera présentée ultimement en mDO/g prot/min. L'inhibition avec le donepezil a aussi été testée en parallèle afin de s'assurer du dosage spécifique de l'AChE (figure A.7). Les résultats confirment qu'il s'agit effectivement de l'activité de l'AChE qui est dosée en raison de l'inhibition complète par le donepezil (inhibiteur spécifique).



**Figure A.8** Activité de l'AChE (mDO/ $\mu$ l/min) dans différents milieux réactionnel faisant varier le volume de lysat de neurones P19 au jour. *Concentration finale d'ACH (0,75mM) et de DTNB (0,3mM). La concentration de donepezil utilisée est 0,184mM. Écart type sur les valeurs de tetraplicatas. La mention 2 lysats représente l'équivalent de 2 puits de neurones P19 resuspendu dans le même volume que pour les autres bandes qui ne comprennent qu'un puits.*



#### A.5 Conclusion de l'appendice :

Jusqu'à maintenant, les tests relatifs à l'évaluation de la viabilité cellulaire et les conditions d'expositions des neurones P19 ont été déterminés. La méthode de dosage de la reeline est fonctionnelle et celle pour le dosage de l'AChE demande encore certains ajustements au niveau de la concentration du substrat utilisé ou du temps alloué à la réaction.

Dans le cadre de ces expositions aux insecticides purs et commerciaux, la quantification de différentes espèces rétinoïdes est aussi prévue en raison de l'implication de l'AR comme facteur de transcription pour la reeline (Chen *et al.*, 2007). Ces investigations auront pour but de mieux comprendre l'implication des néonicotinoïdes dans le développement et le fonctionnement neuronal dans un modèle cellulaire issu de mammifères.

## RÉFÉRENCES

- Albalat, R. (2009). The retinoic acid machinery in invertebrates: ancestral elements and vertebrate innovations. *Molecular and cellular endocrinology*, 313, 23–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.029>.
- Albalat, R. et Cañestro, C. (2009). Identification of Aldh1a, Cyp26 and RAR orthologs in protostomes pushes back the retinoic acid genetic machinery in evolutionary time to the bilaterian ancestor. *Chemico-biological interactions*, 178(1-3), 188–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.017>.
- Allenby, G., Bocquel, M.-T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J. F., Chambon, P. et Levin, A. A. (1993). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors : Interactions with endogenous retinoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 30–34.
- Babino, D., Golczak, M., Kiser, P. D., Wyss, A., Palczewski, K. et von Lintig, J. (2016). The Biochemical Basis of Vitamin A3 Production in Arthropod Vision. *ACS Chemical Biology*, 11, 1049–1057. <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.5b00967>.
- Badiou, A., Meled, M. et Belzunces, L. P. (2008). Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase-A biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 69(2), 246–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.020>.
- Badiou-Bénéteau, A., Benneveau, A., G  ret, F., Delatte, H., Becker, N., Brunet, J. L., Reynaud, B. et Belzunces, L. P. (2013). Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environment international*, 60, 31–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.002>.
- Belyaeva, O. V, Lee, S., Kolupaev, O. V et Kedishvili, N. Y. (2009). Identification and Characterization of Retinoid-Active Short-Chain Dehydrogenases/Reductases in *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(10), 1266–1273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.002>.

- Blaner, W. S. (2001). Cellular metabolism and actions of 13-cis retinoic acid. *Journal of American Academy of Dermatology*, 45(5), 129–135.
- Bonmatin, J. M., Marchand, P. a, Charvet, R., Moineau, I., Bengsch, E. R. and Colin, M. E. (2005). Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5336–41.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0479362>
- Bui-Göbbels, K. (2015). Is retinoic acid a signal for nerve regeneration in insects ? *Neural Regeneration Research*, 10(6), 901–903.
- Burri, B. J. (2015). Beta-cryptoxanthin as a source of vitamin A. *Journal of the science of food and agriculture*, 95(9), 1786–1794.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6942>.
- Campbell, P. G. C, E. Pelletier et F. Denizeau (2004) Écotoxicologie moléculaire: Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement. Presses de l'université du Québec à Montréal. 462 pages.
- Caviness, V. S. (1982). Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: A developmental study based upon [3H]thymidine autoradiography. *Developmental Brain Research*, 4, 293–302. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-3806\(82\)90141-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-3806(82)90141-9).
- Chauzat, M.-P., Carpentier, P., Martel, A.-C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Madec, F., Aubert, M. et Faucon, J.-P. (2009). Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environmental entomology*, 38(3), 514–23.
- Chen, Kundakovic, M., Agis-Balboa, R. C., Pinna, G. et Grayson, D. R. (2007). Induction of the reelin promoter by retinoic acid is mediated by Sp1. *Journal of neurochemistry*, 103(2), 650–65. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04797.x>.
- Chen, Y. et Reese, D. H. (2011). The retinol signaling pathway in mouse pluripotent P19 cells. *Journal of cellular biochemistry*, 112(10), 2865–72.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23200>.
- Curran, T. et D'Arcangelo, G. (1998). Role of reelin in the control of brain development. *Brain research. Brain research reviews*, 26(2-3), 285–94.

- D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M. et Curran, T. (1999). Reelin Is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron*, 24, 471–479.
- dela Sefia, C., Narayanasamy, S., Riedl, K. M., Curley, R. W., Schwartz, S. J. et Harrison, E. H. (2013). Substrate specificity of purified recombinant human  $\beta$ -carotene 15,15'-oxygenase (BCO1). *The Journal of biological chemistry*, 288(52), 37094–37103.
- Deutsch, S. I., Urbano, M. R., Neumann, S., Burket, J. et Katz, E. (2010). Cholinergic abnormalities in autism: is there a rationale for selective nicotinic agonist interventions? *Clinical Neuropharmacology*, 33(3), 114–20.
- Ducharme, P., Maltais, D., Desroches, D., Mateescu, M. et Paquin, J. (2010). Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage. *Neuroscience*, 167(3), 633–43.
- Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., Mcgrath, B., Walsh, C. A., Kreidberg, J. A. et Anton, E. S. (2000). Reelin Binds  $\alpha\beta 1$  Integrin and Inhibits Neuronal Migration, 27, 33–44.
- Eastwood, S. L. et Harrison, P. J. (2003). Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia : towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. *Molecular psychiatry*, 8, 821–831.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr., V. et Featherstone, M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- Farris, S. M., Robinson, G. E., Davis, R. L. et Fahrbach, S. E. (1999). Larval and pupal development of the mushroom bodies in the honey bee, *Apis mellifera*. *The Journal of comparative neurology*, 414(1), 97–113.
- Fatemi, S. H. (2005). Reelin glycoprotein in autism and schizophrenia. *International Review of Neurobiology*, 71(05), 179–187.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F. et Guilhermino, L. (2016). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10(5), 360–75.
- Giroux, I. (2015). *Présence de pesticides dans l'eau au Québec : Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya -- 2011 à 2014, Québec, ministère*



*du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l'état de l'environnement*, ISBN 978-2-550-73603-5, 47 pages et 5 annexes. [En ligne]  
<http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/flrivlac/pesticides.htm>

- Giroux, M., Deschênes, L. and Chassé, R. (2008). Les éléments traces métalliques (ÉTM).
- Goldsmith, T. H. (2013). Evolutionary tinkering with visual photoreception. *Visual neuroscience*, 30, 21–37.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977–987.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J. M., Gerevini, V. D., Dwivedi, Y., Grayson, D. R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R., Uzonov, D. et Costa, E. (2016). Decrease in Reelin and Glutamic Acid Decarboxylase 67 (GAD 67) Expression in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Archives of general psychiatry*, 57, 1061–9.
- Halme, A., Cheng, M. et Hariharan, I. K. (2010). Retinoids regulate a developmental checkpoint for tissue regeneration in *Drosophila*. *Current biology*, 20(5), 458–463.
- Hasselmo, M. E. (2009). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(6), 710–715.
- Hayward, D. C., Bastiani, M. J., Trueman, J. W. H., Truman, J. W., Riddiford, L. M. and Ball, E. E. (1999). The sequence of *Locusta* RXR, homologous to *Drosophila* Ultraspiracle, and its evolutionary implications. *Development Genes and Evolution*, 209, 564–571.
- He, Z. L., Yang, X. E. et Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 19(2-3), 125–40.
- Hébert, M. (2015). *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes* (p. 196).

- Hedrei-Helmer, S., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C. et Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental science and pollution research international*, 22, 8010–8021.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. et Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348–50.
- Henson, T. M., Cory, W. and Rutter, M. T. (2013). Extensive Variation in Cadmium Tolerance and Accumulation among Populations of *Chamaecrista fasciculata*. *PLoS ONE*, 8(5), e63200. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063200>
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B. W., Goffinet, A., Mumby, M. C., Cooper, J. A. et Herz, J. (1999). Direct Binding of Reelin to VLDL Receptor and ApoE Receptor 2 Induces Tyrosine Phosphorylation of Disabled-1 and Modulates Tau Phosphorylation, 24, 481–489.
- Huang, P., Chandra, V. and Rastinejad, F. (2014). Retinoic Acid Actions through Mammalian Nuclear Receptors. *Chemical Reviews*, 114(1), 233–254.
- Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O. I., Soto, C. et Garrido, J. (1996). Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- Beta -Peptides into Alzheimer's Fibrils : Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron*, 16, 881–891.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. et Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2897–908.
- Jones, A., Harrington, P. et Turnbull, G. (2014). Neonicotinoid concentrations in arable soils after seed treatment applications in preceding years. *Pest management science*. 70, 1780-1784.
- Jones, A. K., Raymond-delpéch, V., Thany, S. H., Gauthier, M. et Sattelle, D. B. (2006). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee , *Apis mellifera*, *Genome research*, 16, 1422–1430.
- Jossin, Y., Bar, I., Ignatova, N., Tissir, F., De Rouvroit, C. L. et Goffinet, A. M. (2003). The reelin signaling pathway: some recent developments. *Cerebral cortex*, 13(6), 627–33.

- Kara, T. (2013). Seasonal variation of vitamin and sterol content in chironomidae larvae. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16(22), 1579–1583.
- Kempers, M., Kozak, P., Lafreniere, R., Morris, J., Pernal, S., Sproule, J. et Van, P. (2015). *Canadian Association of Professional Apiculturists Statement on Honey Bee Wintering Losses in Canada (2015)* (p. 1–14).
- Kim, Y.-S., Kim, N.-H., Kim, H.-J., Lee, J.-K., Kim, S.-W. et Oh, D.-K. (2007). Effective production of retinal from beta-carotene using recombinant mouse beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1339–1345.
- Kim, Y.-S. et Oh, D.-K. (2009). Substrate specificity of a recombinant chicken beta-carotene 15,15'-monooxygenase that converts beta-carotene into retinal. *Biotechnology letters*, 31(3), 403–408.
- Koenigsberger, C., Chiappa, S. et Brimijoin, S. (1997). Neurite Differentiation Is Modulated in Neuroblastoma Cells Engineered for Altered Acetylcholinesterase Expression. *J. Neurochem.*, 69, 1389–1397.
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G. et Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS one*, 7(1), e29268.
- Kumar, K., Patro, N. et Patro, I. (2013). Impaired structural and functional development of cerebellum following gestational exposure of deltamethrin in rats: role of reelin. *Cellular and molecular neurobiology*, 33(5), 731–46.
- Lagadic, L. (dir.), T. Caquet, et J. C. Amiard, (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Paris. Éditions: Masson. 340 pages
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Larhantec, M., Delbac, F. et Poulighen, H. (2012). Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution*, 170, 254–259.
- Lampert, J. M., Holzschuh, J., Hessel, S., Driever, W., Vogt, K. et von Lintig, J. (2003). Provitamin A conversion to retinal via the beta,beta-carotene-15,15'-oxygenase (bcox) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. *Development*, 130(10), 2173–2186.



- Levenson, J. M., Qiu, S. et Weeber, E. J. (2008). The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene. *Biochimica et biophysica acta*, 1779(8), 422–31.
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development , regeneration and maintenance of the nervous system, *Nature reviews (Neuroscience)*, 8, 755-765.
- MAPAQ. (2009). Monographie de l'inustrie des grains du Québec. 63 pages.
- McBurney, M. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 140(37), 135–140.
- Meshorer, E. et Soreq, H. (2006). Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends in neurosciences*, 29(4), 216–24.
- Mommaerts, V., Reynders, S., Boulet, J., Besard, L., Sterk, G. et Smagghe, G. (2009). Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology*, 19(1), 207–15.
- Morgano, M., Teixeira Martins, M. C., Rabonato, L. C., Milani, R. F., Yotsuyanagi, K. et Rodriguez-Amaya, D. B. (2010). Inorganic contaminants in bee pollen from southeastern Brazil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(11), 6876–83.
- Nakamura, A., Stiebler, R., Fantappiè, M. R., Fialho, E., Masuda, H. et Oliveira, M. F. (2007). Effects of retinoids and juvenoids on moult and on phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Acta tropica*, 103(3), 222–30.
- Němec, V., Kodrik, D., Matolin, S. et Lauferg, H. (1993). Juvenile Hormone-like Effects of Retinoic Acid in Insect Metamorphosis, Embryogenesis and Reproduction. *Journal of inse*, 39(12), 1083–1093.
- Nowickyj, S. M., Chithalen, J. V., Cameron, D., Tyshenko, M. G., Petkovich, M., Wyatt, G. R., Jones, G. et Walker, V. K. (2008). Locust retinoid X receptors : 9-Cis-retinoic acid in embryos from a primitive insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9540–9545.
- Oberhauser, V., Voolstra, O., Bangert, A., von Lintig, J. et Vogt, K. (2008). NinaB combines carotenoid oxygenase and retinoid isomerase activity in a single



polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 19000–19005.

- Parent, C. 2011. Le bilan des ventes des pesticides en milieu agricole au Québec: contribution des semences traitées aux néonicotinoïdes en grandes cultures. 17 mars 2011.
- Pramatarova, A., Ochalski, P. G., Lee, C. et Howell, B. W. (2006). Mouse Disabled 1 Regulates the Nuclear Position of Neurons in a Drosophila Eye Model Mouse Disabled 1 Regulates the Nuclear Position of Neurons in a Drosophila Eye Model. *Molecular and cellular bioogy*, 26(4), 1510–1517.
- Quattrocchi, C. C., Wannenes, F., Persico, A. M., Ciafré, S. A., D’Arcangelo, G., Farace, M. G. et Keller, F. (2002). Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *The Journal of biological chemistry*, 277(1), 303–9.
- Reboul, E. (2013). Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*, 5(9), 3563–3581.
- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E. et Cunningham Jr., F. X. (2001). Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *The Journal of biological chemistry*, 276(9), 6560–6565.
- Rhee, E. et Plutzky, J. (2012). Retinoid Metabolism and Diabetes Mellitus. *Diabetes and Metabolism Journal*, 36, 167–180.
- Rhinn, M. et Dollé, P. (2012). Retinoic acid signalling during development. *Development*, 139(5), 843–58.
- Rice, D. S. et Curran, T. (2001). Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annual reviews in neuroscience*, 24, 1005–1039.
- Rodrigues, K. J., Santana, M. B., Do Nascimento, J. L. M., Picanço-Diniz, D. L. W., Maués, L. L., Santos, S. N., Ferreira, V. M. M., Alfonso, M., Durán, R. et Faro, L. R. F. (2010). Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(1), 101–7.

- Rortais, A., Arnold, G. et Halm, M. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides : estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees 1. *Apidologie*, 36, 71–83.
- Saint-Laurent, D., Hähni, M., St-Laurent, J. et Baril, F. (2010). Comparative assessment of soil contamination by lead and heavy metals in riparian and agricultural areas (southern Québec, Canada). *International journal of environmental research and public health*, 7(8), 3100–14.
- Schaafsma, A., Limay-Rios, V., Baute, T., Smith, J. et Xue, Y. (2015). Neonicotinoid insecticide residues in surface water and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *PloS one*, 10(2), e0118139.
- Schmuck, R., Scho, R., Stork, A. et Schramel, O. (2001). Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science*, 57, 225–238.
- Sheets, L. P., Li, A. A., Minnema, D. J., Collier, R. H., Creek, M. R. et Pepper, R. C. (2016). A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. *Critical reviews in toxicology*, 46(2), 153–190.
- Silman, I. et Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: “Classical” and “non-classical” functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, (5), 293–302.
- Soprano, D. R., Teets, B. W. et Soprano, K. J. (2007). Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Vitamins and hormones*, 75(06), 69–95.
- Sukiban, J., Bräunig, P., Mey, J. et Bui-Göbbels, K. (2014). Retinoic acid as a survival factor in neuronal development of the grasshopper, *Locusta migratoria*. *Cell and tissue research*, 358, 303–312.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. et Sutton, D. J. (2012). Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Dans A. Luch (dir.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Volume 3: Environmental Toxicology*, 101 (p. 133–164). Basel : Springer Basel.
- van Engelsdorp, D. et Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology*, 103 Suppl (2010), S80–95.

- Wang, T. et Montell, C. (2005). Rhodopsin formation in *Drosophila* is dependent on the PINTA retinoid-binding protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(21), 5187–94.
- Winder, S. J. (2004). Filopodia formation and Disabled degradation downstream of Reelin. *The Biochemical journal*, 384(1), e1–2.
- Yang, E. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. L. et Chang, L. H. (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 101(6), 1743–8.